ORSAY
n° d'ordre : 3479

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le Titre de DOCTEUR de 3ème Cycle
Spécialité : PHYTOPATHOLOGIE

PAR

BENKHEMMAR Omar

SUJET : CONTRIBUTION A LA PROTECTION DES PRODUITS CEREALIERS TRAITES PAR *ASPERGILLUS ORYZAE* CONTRE LA POLLUTION PAR UNE MYCOTOXINE L'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE

soutenue le 4 Juillet 1983 devant la Commission d'examen

MM.	J. CHEVAUGEON	Président
	G. BOMPEIX	Rapporteur
	I. BOUVIER	
	A. CAUDEMER	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ORSAY
n° d'ordre :

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le Titre de DOCTEUR de 3ème Cycle
Spécialité : PHYTOPATHOLOGIE

PAR

BENKHEMMAR Omar

SUJET : CONTRIBUTION A LA PROTECTION DES PRODUITS CEREALIERS TRAITES PAR *ASPERGILLUS ORYZAE* CONTRE LA POLLUTION PAR UNE MYCOTOXINE L'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE

soutenue le 4 Juillet 1983 devant la Commission d'examen

MM.	J. CHEVAUGEON	Président
	G. BOMPEIX	Rapporteur
	I. BOUVIER	
	A. GAUDEMER	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543515_0037

SUMMARY

α-cyclopiazonic acid (αCA) is a mycotoxin produced by *Aspergillus oryzae*. This toxin is detected in culture medium, after chemical extraction, by thin layer chromatography, ultra-violet spectrometry and NMR ^{1}H. An increase in pH and the inhibition of bacterial growth (*E. coli* and *B. subtilis*) are closely correlated with the presence of αCA in the culture medium. These two characteristics were used as screens to isolate strains having modified ability to synthezise αCA after mutagenic treatment.

These mutants, which also bore markers for auxotrophy, allowed the study of the genetical control of αCA production, through the formation of heterocaryons "forced" by confrontations (vegetative anastomoses) or through protoplast fusions.

Heterocaryotic strains were obtained between αCA producing mutants, between non producing mutants, and between producing and non producing mutants. They remained stable at least until the sixth asexual generation. Results from these crosses suggest that αCA synthesis is controlled by a small number of genes. In heterocaryons isolated after confrontation between producing and non producing mutants, the mycotoxin synthesis is dependent on the ratio of parental nuclei, and this ratio is determined genetically.

KEY WORDS :

Aspergillus oryzae, α-cyclopiazonic acid, Chemical characterization, Screen, Mutagenesis, Protoplasts, Heterocaryosis.

AVANT-PROPOS

Il m'est agréable d'exprimer en premier lieu toute ma reconnaissance et mes remerciements à Monsieur le Professeur CHEVAUGEON pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire et pour la confiance qu'il a témoigné à mon égard, ainsi que ses précieux conseils qui ont largement contribué à la soutenance de cette thèse.

Je suis très reconnaissant à Isabelle BOUVIER qui a guidé mes pas sur le difficile chemin de la recherche. Sans elle, ce travail n'aurait pas pu être entrepris. Je tiens à la remercier très sincèrement pour l'intérêt permanent qu'elle a manifesté à l'égard de mon travail et pour ses compétences dont elle m'a fait largement bénéficier dans un climat d'amitié et d'optimisme qui m'ont constamment stimulé et aidé à surmonter toutes les difficultés.

La caractérisation chimique de l'acide α-cyclopiazonique a été effectuée dans le Laboratoire de Chimie de Coordination Bioorganique de l'Université Paris XI sous la direction de Monsieur le Professeur GAUDEMER et grâce à la collaboration efficace de Madame GAUDEMER. Je tiens à leur exprimer mon amicale gratitude pour leur accueil chaleureux et leur constante disponibilité en les remerciant très vivement.

Je désire remercier sincèrement Monsieur le Professeur BOMPEIX d'avoir bien voulu être le rapporteur de ma thèse.

Mes remerciements vont aussi à Marie-Josée DABOUSSI pour ses suggestions et ses critiques enrichissantes qui ont été pour moi une aide continuelle.

Je ne saurais oublier la gentillesse et le soutien technique durant ce travail de Françoise GRISOLLET, ni l'aide et la sympathie de Jeannine MOMMEJA. Je les remercie vivement et je leur exprime toute ma gratitude.

Que Madame MEUNIER qui a assuré avec diligence la tâche ingrate qui est la réalisation de la dactylographie de ce manuscrit, soit assurée de ma reconnaissance.

Je ne peux oublier toutes les personnes du Laboratoire de Cryptogamie qui m'ont apporté leur aide technique et leur soutien moral tout au long de mon séjour en France et qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Je me permets de leur exprimer ma sympathie et toute mon amitié.

Enfin, mes plus vifs remerciements vont à mes parents pour les innombrables sacrifices qu'ils m'ont consentis pendant toute la durée de mes études, sans oublier le soutien moral de tous les membres de ma famille.

PLAN

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE : MATERIEL ET METHODES 3

CHAPITRE I : MATERIEL BIOLOGIQUE : *ASPERGILLUS ORYZAE* 3

1.1. Position systématique 3
1.2. Biologie d'*Aspergillus oryzae* 3
1.2.1. Cycle de développement 3
1.2.2. Stabilité des souches 4
1.3. Intérêt d'*A. oryzae* dans les industries agro-alimentaires 4
1.4. Le problème de la production de toxines par *Aspergillus oryzae* 4
1.5. Choix des souches et leurs caractéristiques biologiques 5
1.5.1. Choix des souches 5
1.5.2. Caractéristiques biologiques des deux souches 6
1.5.2.1. Aspect des thalles 6
1.5.2.2. Les conidies des deux thalles 6
a) Nombre de noyaux par conidie 6
b) Germination des conidies 7

CHAPITRE II : METHODES ET CONDITIONS CULTURALES 8

2.1. Entretien des deux souches 8
2.1.1. Milieux naturels 8
2.1.2. Milieux synthétiques 8
2.1.3. Stabilisation des souches : technique de clonage 8
2.1.4. Conditions physiques optimales 9
2.1.4.1. Mesure de la croissance 9
2.1.4.2. Mesure de la sporulation 10
2.2. Conditions de production de la toxine 11
2.2.1. Milieux de production 11
2.2.2. Technique de production 11

CHAPITRE III : METHODES D'ANALYSE 12

3.1. Mutagenèse et sélection de mutants 12
3.1.1. Les agents mutagènes 12
3.1.1.1. Traitement par le rayonnement ultra-violet 12
3.1.1.2. Traitement par la nitrosoguanidine 12

3.1.2. Sélection de mutants auxotrophes 13
a) Besoins en acides aminés 13
b) Besoins en bases 14
c) Besoins en vitamines 15
3.1.3. Sélection de mutants résistants à un inhibiteur 15
3.1.4. Sélection d'individus double-mutants 16
3.1.5. Sélection de mutants possédant des taux de toxine modifiés 16
3.2. Analyse par recombinaison mitotique 17
3.2.1. Utilisation des anastomoses végétatives 17
3.2.1.1. Observation des anastomoses 17
3.2.1.2. Synthèse de thalles prototrophes 17
a) Méthode des mélanges de conidies 17
b) Méthode des boutures cubiques 17
c) Méthode des semis linéaires 18
3.2.2. Utilisation de la fusion de protoplastes 18
3.2.2.1. Conditions d'obtention de protoplastes 18
3.2.2.2. Fusion des protoplastes 19
3.3. Mise en évidence de la production d'acide α-cyclopiazonique 19
3.3.1. Extraction de l'αCA 19
3.3.2. Caractérisation de l'acide α-cyclopiazonique dans les extraits bruts 20
3.3.2.1. Chromatographie en couche mince 20
3.3.2.2. Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet 21
3.3.2.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire 22

DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE LA PRODUCTION D'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE CHEZ ASPERGILLUS ORYZAE RECHERCHE D'UN CRIBLE BIOLOGIQUE SELECTION DE MUTANTS 24

CHAPITRE I : ETUDE DE LA PRODUCTION D'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE 24

I.1. Revue bibliographique concernant la production d'αCA 24
1.1.1. Mise en évidence de la production d'αCA 24
1.1.2. Identification de l'αCA 24
1.1.3. Biosynthèse de l'αCA 25
1.1.4. Influence de différents facteurs sur la production d'αCA 26
a) Effet de l'addition des précurseurs sur la production d'αCA 26
b) Effet du pH sur la production d'αCA 26
c) Effet de quelques ions métalliques sur la production d'αCA 26

1.2. Détection de l'αCA dans les extraits de milieux de culture 27
1.2.1. Chromatographie en couches minces de silice 27
1.2.2. Spectrométrie dans l'ultra-violet 27
1.2.3. Résonance magnétique nucléaire des protons 29
a) Analyse structurale 29
b) Analyse quantitative 31

CHAPITRE II : RECHERCHE D'UN CRIBLE BIOLOGIQUE 34

2.1. Activité anti-bactérienne de certaines toxines : Revue bibliographique 34
2.2. Propriétés biologiques de l'acide α-cyclopiazonique 35
2.2.1. Effet des filtrats des milieux de culture sur la croissance d'*E. coli* et de *B. subtilis* 35
2.2.2. Effet des extraits bruts 36
2.2.3. Caractérisation directe de la présence d'acide α-cyclopiazonique 36
2.2.4. Conclusion 37
2.3. Effet de la production d'αCA sur le pH du milieu de culture 38
2.4. Conclusion 39

CHAPITRE III : RECHERCHE DE MUTANTS MODIFIES DANS LEUR APTITUDE A PRODUIRE LA TOXINE 41

3.1. Choix de l'agent mutagène 41
3.1.1. Courbes de survie 41
3.1.2. Nombre de noyaux par conidie en fonction de l'âge des thalles 42
3.1.3. Discussion 42
3.2. Recherche et obtention de mutants αCA modifiés 43
3.2.1. Recherche de mutants 43
3.2.2. Caractéristiques biologiques de ces mutants 44
3.2.3. Obtention d'un mutant hyperproducteur d'αCA 45
3.3. Conclusion 45

TROISIEME PARTIE : HETEROCARYOSE ET RECOMBINAISON MITOTIQUE 46

INTRODUCTION 46

CHAPITRE I : OBTENTION DE LIGNEES GENETIQUEMENT MARQUEES 47

1.1. Marquage par une auxotrophie 47
1.1.1. Obtention de mutants auxotrophes 47
1.1.2. Caractéristiques biologiques des auxotrophes retenus 48

1.2. Marquage par une résistance au bénomyl 48

CHAPITRE II : SYNTHESE D'HETEROCARYONS "FORCES" 50

2.1. Par la voie des anastomoses 50

2.1.1. Réalisation des anastomoses 50

2.1.2. Obtention de thalles prototrophes 50

2.1.3. Conclusion 50

2.2. Utilisation de la fusion des protoplastes 51

2.2.1. Aperçu bibliographique 51

2.2.2. Obtention des protoplastes 52

2.2.3. Réalisation de la fusion des protoplastes 52

a) Fusion de protoplastes provenant de souches conduisant à des thalles prototrophes par la voie des anastomoses 52

b) Fusion de protoplastes provenant de souches n'ayant jamais engendré de thalles prototrophes par confrontation 54

2.3. Analyse des thalles prototrophes 55

2.3.1. Hypothèses de travail 55

2.3.2. Stabilité des hétérocaryons 56

2.3.3. Analyse des conidies des générations successives 56

2.3.4. Discussion des résultats et conclusion 56

a) Taux de germination des conidies parentales sur milieu complet 57

b) Niveau de complémentation 58

CHAPITRE III : INFLUENCE DE L'HETEROCARYOSE SUR LA PRODUCTION D'αCA 60

3.1. Production d'αCA par les thalles hétérocaryotiques 60

3.1.1. Mesure de cette production 60

3.1.2. Discussion des résultats 60

a) Confrontations entre souches productrices d'αCA toutes issues de la souche 102.07 60

b) Confrontations entre souches non productrices d'αCA de même origine 61

c) Confrontations entre souches non productrices d'αCA d'origines différentes 61

d) Confrontations entre souches productrices et non productrices d'αCA 61

CONCLUSION 65

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 68

BIBLIOGRAPHIE 72

INTRODUCTION

En médecine humaine ou vétérinaire, les champignons filamenteux sont souvent responsables de toxicoses. Ces toxicoses sont des intoxications qui résultent de l'ingestion de nourritures contenant des métabolites fongiques. Elles ne sont ni contagieuses ni infectieuses.

Il a été montré que certains champignons microscopiques appelés communément moisissures, croissent et prolifèrent sur des denrées alimentaires et des céréales stockées. Les toxines qu'elles excrètent diffusent dans les aliments de sorte que le consommateur peut en subir les effets même en l'absence de la moisissure responsable. D'autre part, en raison des potentialités industrielles considérables qu'offrent certaines de ces moisissures, elles sont actuellement de plus en plus utilisées dans l'industrie agro-alimentaire.

Aspergillus oryzae, sur lequel nous avons travaillé, est une moisissure saprophytique du pain, de la farine et des grains de blé et de riz stockés dans les silos. Ce champignon est utilisé aussi dans l'industrie alimentaire. Dans les pays orientaux, il joue un rôle important dans la saccharification de l'amidon contenu dans la pâte du riz intervenant dans la fabrication du "saké" (alcool de riz) et de la sauce de Soja. En Occident, son aptitude à produire une enzyme : l'α-amylase, permet son utilisation dans de nombreux domaines industriels.

Mais, l'utilisation d'*A. oryzae* dans l'industrie agro-alimentaire pose un grand problème. En effet, comme l'a montré ORTH en 1977 (52), il s'avère que certaines souches de cette moisissure produisent une substance toxique : l'acide α-cyclopiazonique (αCA), dont la toxicité a été prouvée chez divers animaux.

Pour éviter tout risque d'intoxication du consommateur, l'utilisation de souches incapables de produire cette toxine s'avère indispensable. La recherche systématique de telles souches non productrices au sein d'une population naturelle (productrice) ou mutagénisée nécessite d'être en possession d'un crible positif simple et relativement sensible permettant de détecter la production ou la non production d'acide α-cyclopiazonique.

La mise au point d'un tel crible a fait l'objet de la première partie du travail qui nous a été confié. La description par ORTH (52) de deux souches d'*Aspergillus oryzae* l'une productrice d'acide α-cyclopiazonique et l'autre non,

offrait un fil conducteur pour la recherche de ce test. En possession de cette paire de souches différant par tout ou rien pour la synthèse de l'acide α-cyclopiazonique, il était en effet concevable de tenter de les caractériser, en conditions de synthèse et d'excrétions optimales, par d'autres propriétés plus aisées à mettre en évidence et corrélées avec leurs aptitudes *a priori* différentes à produire cette toxine.

L'obtention de ce crible va permettre d'identifier très simplement et très rapidement des souches ne produisant pas d'αCA. Mais tous les problèmes ne sont pas résolus pour autant. En effet, l'industrie agro-alimentaire utilise fréquemment des mélanges de souches d'aptitudes complémentaires. Si des souches différentes d'*A. oryzae* ne produisant pas l'αCA, sont bloquées à des étapes différentes de la chaîne de biosynthèse de cette toxine, nous pouvons penser que leur mélange pourra rétablir la production de l'αCA. Si un tel phénomène intervient, il peut représenter un danger pour le consommateur. Chez *Aspergillus oryzae* la formation spontanée d'anastomoses, donc de possibilités d'échanges de matériels cytoplasmique et génétique, peut laisser supposer que de telles recombinaisons sont possibles.

Sur un plan plus fondamental, la réalisation de mutants modifiés dans leur aptitude à produire l'αCA et la mise en place de diverses étapes du cycle parasexuel, en absence de sexualité, pouvaient permettre d'acquérir des connaissances sur les mécanismes génétiques qui gouvernent la biosynthèse de l'αCA. Ceci a fait l'objet de la seconde partie de notre travail.

PREMIERE PARTIE : MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I : MATERIEL BIOLOGIQUE : *ASPERGILLUS ORYZAE*

I.1. POSITION SYSTEMATIQUE

En 1945, THOM et RAPER (70) dans leur Manuel of Aspergilli, indiquent que la détermination précise d'*Aspergillus oryzae* est délicate. Il semble d'après eux qu'il existe une variation continue entre la souche décrite à l'origine par COHN en 1884 et *Aspergillus flavus*. Pour les différencier, ces auteurs se sont basés sur la longueur de leurs conidiophores et sur leur sporulation. En effet, *A. oryzae* émet des conidiophores longs mais sporule assez faiblement. Par contre, *A. flavus* a une sporulation plus abondante et des conidiophores courts.

Nous avons adopté la classification de RAPER et FENNELL (57) décrivant *Aspergillus oryzae* comme un Ascomycète faisant partie des champignons imparfaits, ordres des Aspergillales, famille des Aspergillées, genre *Aspergillus*, espèce *oryzae*.

I.2. BIOLOGIE D'*ASPERGILLUS ORYZAE*

I.2.1. Le cycle de développement

Le thalle d'*A. oryzae* forme un mycélium hyalin. Ce mycélium est constitué d'hyphes cloisonnées à intervalles irréguliers isolant des articles plurinucléés. L'existence de pores dans les cloisons permet une communication entre ces articles. Sur la partie la plus âgée du thalle, apparaissent plus ou moins tardivement suivant les souches des conidiophores dressés sous forme d'un renflement terminal qui porte soit directement des phialides soit un ou deux rangs de stérigmates qui à leur tour porteront une ou deux rangées de phialides (ISHITANI et SAKAGUCHI) (24) et (25). La différenciation des conidies est basipète, c'est-à-dire que lorsque la phialide a émis une première conidie, un second bourgeonnement se produit au même niveau sous cette première conidie isolant ainsi une nouvelle conidie. Généralement, dès leur formation, les conidies se détachent de la phialide. Ces conidies ont une forme globuleuse à élliptique et une paroi plus ou moins ornementée et colorée donnant ainsi une couleur verte au thalle. ISHITANI et SAKAGUCHI (23) ont montré que les conidies sont plurinucléées et que les conidies de certaines souches d'*A. oryzae* contiennent jusqu'à 20 noyaux dans la plupart

des cas, le nombre de noyaux par conidie ne dépasse pas une dizaine. Pour ces auteurs, la jeune conidie est à deux noyaux et les mitoses successives confèrent à la conidie adulte son état nucléaire définitif. Signalons aussi que la plupart des souches d'*A. oryzae* possèdent des aptitudes à s'anastomoser entre elles.

1.2.2. Stabilité des souches

De nombreuses souches d'*A. oryzae* sont morphologiquement instables. Cette instabilité se traduit par l'apparition de secteurs phénotypiquement différents entre eux à un moment quelconque de la croissance. Ce phénomène est général chez d'autres espèces d'*Aspergillus*, mais il est plus fréquent chez l'espèce *oryzae* (ISHITANI et SAKAGUCHI) (23). Ce phénomène peut s'expliquer par l'existence de plusieurs noyaux dans les conidies et dans les hyphes mycéliennes. Effectivement, la sectorisation résulte d'un changement dans l'état nucléaire. Ceci, soit par la rupture de l'hétérocaryose (séparation des types nucléaires ou leur fusion), soit par l'addition d'une mutation créant ainsi un hétérocaryon renfermant à la fois les types originel et mutant. L'obtention de clones stables serait d'autant plus rapide et plus facile que le nombre de noyaux contenu dans les conidies serait faible. Le critère de stabilité qui a été retenu est l'obtention de types morphologiquement stables après plusieurs clonages monoconidiens successifs.

1.3. INTERET D'*A. ORYZAE* DANS LES INDUSTRIES AGRO-ALIMENTAIRES

A. oryzae est très utilisé dans les industries agro-alimentaires, essentiellement dans les pays orientaux. Ainsi, il intervient dans la saccharification de l'amidon contenu dans la pâte du riz entrant dans la fabrication du "saké" (alcool du riz). Il est aussi utilisé pour préparer la sauce de soja et le "koji" qui une fois séché sert à fabriquer le bouillon du riz fermenté (49). En Occident, *A. oryzae*, cultivé en fermentation, permet la production d'une enzyme : l'α-amylase qui a une très grande importance industrielle. L'α-amylase est utilisée dans l'industrie boulangère pour suppléer aux déficiences du blé en amylase lors de la panification. Dans l'industrie textile, elle est utilisée pour le décatissage.

1.4. LE PROBLEME DE LA PRODUCTION DE TOXINES PAR *ASPERGILLUS ORYZAE*

Dans les conditions d'utilisation d'*A. oryzae* dans l'industrie agro-alimentaire, essentiellement en fermentation, l'aptitude qu'ont certaines souches à produire diverses toxines présente un danger pour le consommateur. Ceci pose donc un problème dans le choix des souches à utiliser dans l'industrie agro-alimentaire. Effectivement, certains auteurs (31) et (32) ont montré que des

filtrats de cultures d'une souche d'*A. oryzae* étaient susceptibles de provoquer de graves lésions avec dégénérescence graisseuse du foie et incoordination des mouvements chez les souris et les cobayes auxquels ils étaient injectés. Au Maroc (45), en 1953, on a constaté un empoisonnement du même type dans un troupeau de chèvres qui avaient inconsidérément consommé des appâts au son, destinés à détruire les criquets, et sur lesquels s'était développé l'*A. oryzae*. A Tokyo (49) de nombreuses vaches laitières moururent dans une exploitation agricole. On s'aperçut que la responsabilité en incombait au malt moisi que l'on donnait en nourriture pour favoriser la croissance des animaux, la moisissure fut déterminée comme étant *A. oryzae*. Parmi de nombreuses toxines produites par *A. oryzae*, nous citerons ici les aspergillomarasmines A et B (49), l'oryzacidine (62), (63) et (64), l'acide anhydro-lycomarasmique (49), l'acide kojique que DATTA (7) considère aux Indes comme responsable de cancers, en liaison peut-être avec des mycoplasmes. Toutes ces toxines sont des composés peptidiques proches de certaines toxines de flétrissement des plantes (49). IIZUKA et IIDA (20) reconnurent que ce champignon élaborait aussi une toxine puissante, qu'ils nommèrent : maltoryzine. D'autres auteurs (52) ont montré que *A. oryzae* produit par ailleurs les toxines chimiques suivantes : l'aflatoxine, la stérigmatocystine, l'acide β-propionique et plus récemment l'acide α-cyclopiazonique auquel nous nous sommes intéressés plus particulièrement au cours de ce travail. L'acide α-cyclopiazonique est une neurotoxine (49) dont l'ingestion provoque, outre les diarrhées, des convulsions chez le canard, le poulet et le rat. La DL_{50} par voie intrapéritonéale pour le rat mâle est de 2,3 mg/kg (17). Sa toxicité chez les rats a été prouvée aussi par PURCHASE (56). GIBEL (12) a même montré que l'acide α-cyclopiazonique pouvait avoir un effet cancérigène sur ceux-ci. Certains auteurs (52) ne cachent pas que la présence de cette toxine dans l'alimentation peut aussi présenter un danger pour l'homme.

1.5. CHOIX DES SOUCHES ET LEURS CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES

1.5.1. Choix de deux souches

Les deux souches sur lesquelles nous avons travaillé sont celles utilisées par ORTH (52) et que nous nous sommes procurés au Centraal Bureau Voor Schimmelcultures de Baarn sous les références 102.07 et 115.33.

En 1977, ORTH (52) a montré que la souche 115.33 ne produit pas d'acide α-cyclopiazonique, alors que la souche 102.07 en produit. Ce schéma nous a semblé idéal pour essayer de mettre au point un crible visant à distinguer les deux types de souches quant à leur aptitude à produire ou non la toxine.

Photo n° 1 - Morphologie des deux souches d'*Aspergillus oryzae* 115.33 et 102.07 sur PDA

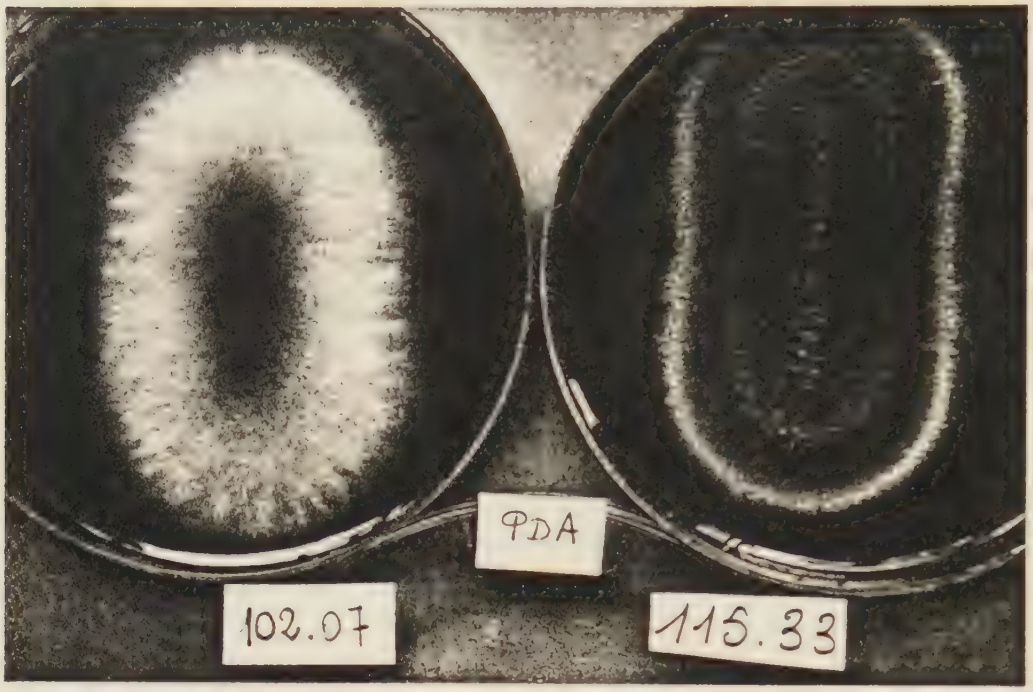


Photo n° 2 - Coloration au Giemsa des noyaux des conidies provenant de thalles jeunes

1.5.2. Caractéristiques biologiques des deux souches

1.5.2.1. Aspect des thalles

Sur les différents milieux que nous avons utilisés, chacune des deux souches est facilement distinguable. De façon constante, on remarque que la souche 115.33 donne un thalle pauvre mais sporule précocement (3 jours) et abondamment. Ceci confère à cette souche une couleur vert-foncé brunissant fortement en vieillissant. Par contre, la souche 102.07 produit un mycélium hyalin abondant et ne sporule que tardivement (5 jours) d'où un aspect plus blanc de ce thalle (photo n° 1).

1.5.2.2. Les conidies des deux souches

Les conidies des deux souches observées au microscope montrent une forme globuleuse à elliptique et une paroi plus ou moins ornementée. On remarque que leur taille est variable, ceci peut-être en relation avec le nombre de noyaux qu'elles contiennent.

a) Nombre de noyaux par conidie

Afin de déterminer le nombre de noyaux contenus dans les conidies des deux souches (115.33 et 102.07), nous les avons colorés à l'aide du colorant de Giemsa (Giemsa R.A.L.).

Pour cela, des fragments de jeunes thalles (trois à cinq jours suivant les souches) et de thalles plus âgés (dix à douze jours) de chacune des deux souches sont maintenus 24 heures à l'obscurité dans un fixateur composé de trois volumes de chloroforme, d'un volume d'acide acétique glacial et de six volumes d'alcool absolu. Le matériel ainsi fixé subit ensuite des passages successifs de 10 minutes dans des bains d'alcool à 95°, 75° puis 50° afin de réhydrater les cellules avant une hydrolyse dans de l'acide chlorhydrique 5N à température ambiante pendant 30 minutes. Le matériel est alors rincé dans de l'eau distillée puis dans une solution tampon phosphate à pH 7 (10 ml d'une solution phosphate monopotassique 0,25 M + 20 ml d'une solution phosphate disodique 0,20 M qsp 1000 ml d'eau distillée). La coloration s'effectue ensuite durant une nuit à température du laboratoire dans du Giemsa dilué à raison de deux gouttes de colorant par ml de solution tampon phosphate pH 7 citée ci-dessus.

Un fragment du matériel ainsi coloré est déposé entre lame et lamelle et observé au microscope photonique. Les observations consistent à compter le nombre de noyaux par conidies provenant des thalles jeunes et des thalles âgés afin de déterminer le nombre moyen de noyaux dans chacun des cas et pour chaque souche. A l'aide d'un micromètre oculaire préalablement étalonné le diamètre moyen de ces deux catégories conidiennes est déterminé.

Le nombre moyen de noyaux par conidie correspond à la moyenne de 50 comptages. De même, le diamètre moyen des conidies correspond à la moyenne de 50 comptages. L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau suivant.

Souches	102.07		115.33	
Age des thalles	5 jours	12 jours	3 jours	10 jours
Nombre moyen de noyaux par conidie	2	4	2	4
Diamètre moyen des conidies	6 µ	14,6 µ	4,8 µ	13,4 µ

En conclusion, nous remarquons donc qu'il y a une relation entre d'une part l'âge du thalle et le nombre de noyaux, d'autre part entre le nombre de noyaux et la taille des conidies.

b) Germination des conidies

Le taux de germination des conidies de chacune des souches sur le milieu d'entretien P.D.A., est déterminé précisément grâce à la technique des lames gélosées. Celle-ci consiste après étalement d'une suspension conidienne, correctement diluée, sur une lame de microscope recouverte d'une mince couche de P.A.D. gélosé, à compter sous le microscope le nombre de conidies germées ramené au nombre total de conidies (germées et non germées). Cette technique permet une observation facile au cours du temps, d'où la possibilité de déterminer le délai de germination et le pourcentage de germination. Nous avons remarqué que les conidies des deux souches commencent à germer au bout de huit heures à 23°C.

Après 24 heures d'incubation dans une enceinte suffisamment humide, nous avons donc pu déterminer le pourcentage de germination des conidies des deux souches qui s'est avéré être de 98% sur le milieu P.D.A.

CHAPITRE II : METHODES ET CONDITIONS CULTURALES

2.1. ENTRETIEN DES DEUX SOUCHES

2.1.1. Milieux naturels

L'observation des deux souches d'*A. oryzae* sur divers milieux couramment utilisés au laboratoire nous a permis de retenir le PDA comme milieu d'entretien courant. Les milieux que nous avons testés au cours de cet essai sont : le milieu M.C.V., le milieu maltéa, le milieu C, le milieu seigle, le milieu M.O.P. et le milieu P.D.A. sur lequel les souches 115.33 et 102.07 croissent et sporulent bien (Annexe 1), de plus, elles présentent des phénotypes nettement différents permettant ainsi de les distinguer aisément.

2.1.2. Milieux synthétiques

Pour la réalisation de certains travaux nécessitant des conditions de culture parfaitement contrôlées, nous avons eu recours à l'utilisation d'un certain nombre de milieux synthétiques : les milieux A, M et B pour la production de la toxine, un milieu minimum pour la sélection d'individus auxotrophes et l'expression de prototrophes au cours de la mise en place du cycle parasexuel. Enfin, les bactéries tests utilisées au cours de ce travail ont été cultivées respectivement sur LB pour *Escherichia coli* et LB + $MgSO_4$ (2 %) pour *Bacillus subtilis* (voir Annexe 2).

2.1.3. Stabilisation des souches : technique de clonage

Comme nous l'avons signalé précédemment, le seul critère de stabilité des souches d' *A. oryzae* retenu par ISHITANI et SAKAGUCHI (23), est l'obtention de types morphologiquement stables après plusieurs clonages successifs à partir des conidies isolées. Pour nos deux souches, surtout pour la souche 115.33 qui présente facilement des secteurs, nous avons adopté le même critère. Il était donc nécessaire de réaliser des clonages monoconidiens. Cette technique consiste à isoler une à une des conidies en début de germination. Pour cela, on recueille par grattage l'ensemble d'un thalle sporulant âgé d'une dizaine de jours dans un mixer MSE contenant de l'eau stérile. Le broyage d'une minute permet de dissocier les chaînes conidiennes avant de récolter les conidies par filtration sur

ANNEXE I : MILIEUX NATURELS

Maltéa :

- Maltéa : 20 g
- Gélose : 20 g
- Eau distillée : 1 litre
- Autoclaver à 120° pendant 40 mn

M.O.P. (Malt-Ose-Peptone)

- Lactose : 40 g
- Malt : 20 g
- Peptone de caséine : 1,5 g
- Agar Roger : 20 g
- Eau distillée : 1 litre
- Ajuster à pH 5 avec l'acide lactique et autoclaver à 115°C pendant 20 mn

M.C.V.

- Glusoe : 40 g
- Malt : 20 g
- Peptone de caséine : 1,5 g
- Peptone bactériologique : 1,5 g
- Agar Roger : 20 g
- Eau distillée : 1 litre

C (Milieu petits pois)

- Mixer 250 g de petits pois (extra-fin) dans 1 litre d'eau ordinaire (le tout doit être homogène)
- Ajouter 3 litres d'eau
- Faire chauffer et maintenir à 60°-70°C pendant 1h30 mn
- Laisser reposer 15 mn à 30 mn à l'étuve
- Filtrer une seule fois sur coton
- Ajouter 20 g de gélose par litre de filtrat
- Autoclaver à 120° pendant 40 mn

ANNEXE I : MILIEUX NATURELS (suite)

Seigle :

- Grains de Seigle : 200 g
- Eau ordinaire : 1000 ml
- Faire bouillir et maintenir l'ébullition pendant une heure
- Filtrer
- Ajuster à 1000 ml
- Ajouter 20 g de gélose
- Autoclaver à 120°C pendant 40 mn

P.D.A. (Potatose Dextrose Agar)

- Eplucher et couper en morceaux 200 g de Pomme de terre
- Faire bouillir 1 heure dans de l'eau ordinaire
- Filtrer
- Ajuster à 1 litre
- Ajouter 20 g de glucose et 20 g de gélose
- Autoclaver à 120°C pendant 40 mn

ANNEXE 2 : MILIEUX SYNTHETIQUES

Milieu A :

- $NaNO_3$: 3 g
- PO_4H_2K : 1 g
- SO_4Mg7H_{20} : 0,5 g
- KCl : 0,5 g
- SO_4 $Fe7H_20$: 0,01 g
- Saccharose : 160 g
- Yeast extract : 20 g
- Eau distillée : 1 litre
- Autoclaver à 110°C pendant 60 mn

Remarque : Pour avoir le milieu A gélosé il faut ajouter 18 g de gélose par litre d'eau distillée

Milieu B :

- Mannitol : 30 g
- Glucose : 10 g
- Acide succinique : 10 g
- KH_2PO_4 : 1 g
- $MgSO_47H_2O$: 0,3 g
- Eau distillée : 1 litre
- Ajuster à pH 5,6 avec du NH_4OH
- Autoclaver à 110°C pendant 40 mn

Remarque : Pour avoir le milieu B gélosé il faut ajouter 17 g de gélose par litre d'eau distillée

ANNEXE 2 : MILIEUX SYNTHETIQUES (suite)

Milieu M :

- Glucose : 60 g
- $NaNO_3$: 4,5 g
- K_2HPO_4 : 1 g
- $Mg\ SO_4 7H_2O$: 0,5 g
- KCl : 0,5 g
- $FeSO_4 7H_2O$: 10 mg
- $ZnSO_4 7H_2O$: 17,5 mg
- $N_9B_4O_7 10H_2O$: 0,7 mg
- $(NH_4^2)MO_7O_{24} 4H_2O$: 0,5 mg
- $CuSO_4 5H_2O$: 0,3 mg
- $MnSO_4 H_2O$: 0,11 mg
- Eau distillée : 1 litre
- Ajuster à pH 5,5 avec du HCl

Remarque : Pour avoir le milieu M gélosé il faut ajouter 17 g de gélose par litre d'eau

Milieu minimum : MM :

- Glucose : 5 g
- Nitrate de potassium : 1,2 g
- Phosphate monopotassique : 3,75 g
- $SO_4\ Mg\ 7H_2O$: 0,5 g
- NaCl : 0,1 g
- $CaCl_2$: 0,1 g
- Potasse : 0,75 g
- Gélose : 29 g
- Eau distillée : 1 litre
- pH : entre 6,2 et 6,8
- Autoclaver à 110°C pendant 40 mn

Milieu L.B. :

- Bactopeptone : 10 g
- Yeast extract : 5 g
- NaCl : 5 g
- Gélose : 12 g
- Eau distillée : 1 litre
- Autoclaver à 110°C pendant 40 mn

Remarque : Pour le milieu LB gélosé dans des tubes ne mettre que 7 g de gélose par litre d'eau

verre fritté de porosité n° 2. La concentration en conidies de la suspension recueillie est évaluée grâce à une cellule de Thoma. Une dilution correcte de cette suspension est mise en culture sur P.D.A. gélosé. Au bout de 20 à 24 heures à 23°C, les conidies ayant émis des hyphes germinatives sont prélevées une à une sous un stéréomicroscope à l'aide d'un microscalpel et transférées sur des milieux neufs.

2.1.4. Conditions physiques optimales

La température optimale de croissance pour nos souches d'*A. oryzae* est de 23°C. Une hygrométrie de 70% est maintenue en chambre de culture. L'entretien courant des souches consiste à les repiquer 2 fois par mois sur milieu P.D.A.

2.1.4.1. Mesure de la croissance

Pour mesurer la croissance des deux souches, nous avons utilisé la technique suivante : des fils de coton stériles de 30 mm de longueur sont trempés dans des suspensions conidiennes d'une concentration de 5.10^6 conidies par ml. Quatorze boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé sont ensemencées en déposant un fil au centre de chaque boîte et placées à 23°C. Des mesures sont effectuées au cours du temps dès les premières 24 heures à l'aide d'un micromètre oculaire placé sur un microscope stéréoscopique préalablement étalonné. Lorsque la croissance est plus importante, les mesures sont faites au double décimètre. Les milieux testés sont : A, M, M.M. et P.D.A. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n° 1.

TABLEAU N° 1

Croissance des deux souches au cours du temps (diamètres en mm)

Souches	102.07				115.33			
Milieux / Jours	A	M	MM	PDA	A	M	MM	PDA
1	1,45±0,5	1,7±0,5	1,85±0,5	1,9±0,5	2,9±0,5	2,66±0,5	2,1±0,5	2,8±0,5
2	7,8 ± 1	7,1± 1	5,3 ± 1	8,3± 1	10,8± 1	9,8 ± 1	6,5± 1	9 ±1,5
3	12 ± 1	14,5± 2	11,3 ± 1	15,5± 1	19,1± 2	17,7 ± 1	11,8± 1	16,4±1,6
4	15 ± 1	21,5± 3	18,4 ± 1	24 ± 2	26,3± 3	24,1 ± 1	17,8± 1	24 ± 1
5	18 ± 1	31 ± 3	24,7 ± 1	31,7± 2	37,5± 2	31,2 ± 1	23,5± 1	30,5± 1
6	22,5 ± 1	37,7± 4	30,2 ± 1	40,5± 2	46,7± 3	35,9 ± 2	28,5± 2	37,5±1,5
7	30,3 ± 2	48,2± 3	38,5 ± 1	47,5± 2	57 ± 2	46,5 ± 2	35,1± 1	44,3± 1
8	39,3 ± 2	57,9± 3	44,5 ± 1	59 ± 2	69,9± 3	52,1 ± 2	40,5± 1	53,2± 2
9	49,8 ± 2	66,2± 3	53,9 ± 1	67,3± 2	77 ± 3	58,6 ± 3	46,5± 1	58,2± 2
10	58,2 ± 2	72,8± 3	59,9 ± 1	75,1± 1	86,9± 3	63,1 ± 4	53,9± 1	66,5± 2

Nous constatons que les deux souches ont une croissance semblable sur PDA. Ce milieu s'avère être le meilleur pour l'entretien courant de nos souches d' *A. oryzae*. Par contre, sur le milieu A, les souches 115.33 et 102.07 ont une croissance très différente. Il semble donc difficile de retenir ce milieu pour comparer la production de toxine entre ces deux souches. Notons de même que sur les milieux synthétiques M et PDA les élongations sont identiques pour une même souche.

2.1.4.2. Mesure de la sporulation

La sporulation des deux souches sur les milieux gélosés A, M, MM et PDA a été mesurée en grattant des thalles âgés de 3 jours, 6 jours et 9 jours de chacune des deux souches. Après mixage d'un thalle dans un même volume d'eau stérile et filtration sur verre fritté de porosité n° 2 (40 à 90 µ), nous avons déterminé à l'aide d'un hématimètre le nombre de spores par thalle. Nous avons résumé les résultats dans les tableaux suivants en précisant que chacun d'entre eux représente la moyenne de sept mesures :

TABLEAU N° 2 - Nombre de conidies par thalle après 3 jours de culture

Souches / Milieux	115.33	102.07
PDA	$4,2.10^6$	0
M	$2,8.10^6$	$0,4.10^6$
A	$1,3.10^6$	0
MM	$4,4.10^6$	$0,6.10^6$

TABLEAU N° 3 - Nombre de conidies par thalle après 6 jours de culture

Souches / Milieux	115.33	102.07
PDA	26.10^6	$7,9.10^6$
M	$59,4.10^6$	$3,1.10^6$
A	$31,8.10^6$	$0,5.10^6$
MM	$13,7.10^6$	$4,4.10^6$

TABLEAU N° 4 - Nombre de conidies par thalle après 9 jours de culture

Souches / Milieux	115.33	102.07
PDA	$1,44.10^8$	$0,36.10^8$
M	$1,83.10^8$	$0,22.10^8$
A	$1,24.10^8$	$0,07.10^8$
MM	$0,31.10^8$	$0,28.10^8$

Nous notons des différences de sporulation entre les deux souches quel que soit le milieu utilisé. La souche 102.07 sporule généralement moins bien que la souche 115.33.

2.2. CONDITIONS DE PRODUCTION DE LA TOXINE

2.2.1. Milieux de production

Pour la production de l'acide α-cyclopiazonique, nous avons choisi de tester dans un premier temps, les milieux A et B d'une part (38), M d'autre part (50) décrits par divers auteurs comme stimulant la production de cette toxine. Nous n'avons pas retenu le milieu B ne convenant pas au développement de nos deux souches. Par contre, les milieux A et M permettent la production d'α-CA en quantité notable.

2.2.2. Technique de production

Après divers essais, nous avons retenu la technique de culture suivante : des erlens de 250 ml contenant 75 ml de milieu A ou M liquides sont ensemencés avec 5.10^5 conidies par erlen. Une incubation de 21 jours à 23°C est nécessaire en culture statique. La toxine émise dans le milieu de culture sera isolée à partir du filtrat de ces cultures.

CHAPITRE III : METHODES D'ANALYSE

3.1. MUTAGENESE ET SELECTION DE MUTANTS

3.1.1. Les agents mutagènes

3.1.1.1. Traitement par le rayonnement ultra-violet

Le rayonnement ultra-violet conduit à des modifications profondes de l'ADN. Son activité biologique est la formation de dimères de thymine qui, s'ils ne sont pas excisés, conduiront à un arrêt de la transcription. Certains systèmes enzymatiques sont capables de dissocier ces dimères de thymine et de rendre ainsi à l'ADN sa structure primitive. Ces systèmes enzymatiques sont généralement photoactivés, d'où la nécessité de travailler à l'obscurité. L'appareillage que nous avons utilisé est constitué d'une lampe à quartz à vapeur de mercure à basse pression et à haute tension émettant à 2537 Å et réglée à 25 ergs par mm^2 par seconde avec un dosimètre.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une courbe de survie des conidies en fonction de doses croissantes d'ultra-violet. Pour cela, nous avons traité des suspensions de conidies jeunes de concentrations connues avec des doses allant de 100 à 10.000 ergs/mm^2/seconde. A partir de dilutions correctes puis d'étalements sur PDA gélosé des suspensions traitées, nous avons évalué le taux de survie de chaque souche après un à trois jours d'incubation à 23°C. Nous avons retenu la dose de 2.000 ergs/mm^2/seconde correspondant à 1% de survie des conidies recueillies après trois jours de culture à partir de la souche 115.33 et après cinq jours de culture à partir de la souche 102.07.

3.1.1.2. Traitement par la nitrosoguanidine

La nitrosoguanidine ou N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine agit préférentiellement au point de replication des chromosomes par fixation d'un radical méthyl sur une base de l'ADN. Cette modification peut entraîner une erreur d'appariement au cours de la replication suivante, conduisant le plus souvent à l'insertion ou à la délétion d'une paire de bases (39).

Des suspensions conidiennes de concentrations connues sont traitées avec des doses de NG allant de 10 à 500 γ (γ = µg/ml) durant 30 minutes à 30°C. Les conidies ainsi traitées sont lavées plusieurs fois successivement dans de l'eau stérile par trois centrifugations à 3000 t/mm pendant 15 minutes afin d'éliminer toute trace de NGT. Le culot final est repris dans un volume d'eau fixe. Après comptage, dilutions convenables puis étalement sur milieu PDA gélosé le taux de survie pour chaque dose est évalué après 1 à 4 jours de culture à 23°C. La dose de 100 γ est retenue comme donnant 10% de survie des conidies issues de thalles jeunes des deux souches.

3.1.2. Sélection de mutants auxotrophes

Pour la recherche de mutants auxotrophes, nous avons traité des conidies provenant de thalles âgés de 5 jours pour la souche 102.07 et de 3 jours pour la souche 115.33 avec une dose de 100 γ de nitrosoguanidine. Après 24 à 48 heures d'incubation à 23°C sur PDA gélosé, nous avons isolé environ 3000 conidies sur PDA. Après 3 jours à 23°C, les différents clones obtenus sont transférés par bouturage sur le milieu minimum en repérant chaque boîte de Pétri. Seuls sont retenus les clones incapables de pousser sur le milieu minimum.

Une technique de sélection d'auxotrophes utilisant des conditions où les prototrophes sont éliminés en présence de nystatine a été testée. Cette substance fongicide ne tuant que les spores en germination a été décrite comme étant efficace chez de nombreux champignons filamenteux (35) (42) et (66). Chez *A. oryzae* par contre, la dose efficace de nystatine étant supérieure à 500 ppm, nous avons renoncé à utiliser cette technique.

La caractérisation des besoins en acides aminés, bases et vitamines des mutants auxotrophes isolés a été menée grâce aux gammes de milieux ci-dessous.

a) Les besoins en acides aminés des mutants sont déterminés à l'aide de 6 milieux (T_1, T_2, ...) composés chacun d'une association différente de 6 acides aminés distincts. Les souches qui ne poussent que sur un seul de ces milieux sont exigentes pour la substance spécifique à ce milieu. Celles qui croissent sur deux ou plusieurs de ces milieux sont exigentes pour le ou les acides aminés communs à ces milieux. Le tableau suivant résume cette clé de détermination.

T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_6
l.ala					
	l.try				
		l.cyst.			
			l.pro		
				l.tyr	
					de.val.
l.aspn	l.aspn				
l.lys		l.lys			
l.asp			l.asp		
l.gln				l.gln	
dl met					dl met
	dl.phe	dl phe			
	dl.his		dl.his		
	dl.ileu			dl.ileu	
	l.arg				l.arg
		l.gly	l.gly		
		l.glu		l.glu	
		dl.norleu			dl.norleu
			l.OH.pro	l.OH.pro	
			dl.thr		dl.thr
				dl.ser	dl.ser

b) Les besoins en bases sont caractérisés en apportant au milieu de base (MM) les quatre groupes de bases suivants :

B1 : - Adénine 100 mg/l
- Guanine 100 mg/l

B2 : - Inosine 100 mg/l
- Aminoimidazole carboxamide (AICAR) 100 mg/l

B3 : - Cytosine 100 mg/l
- Thymine 100 mg/l
- Uracile 100 mg/l

B4 : - Acide orotique 100 mg/l
- Xanthosine 100 mg/l

c) Les besoins vitaminiques sont caractérisés en apportant au milieu de base les trois groupes de vitamines suivants :

Solution V_1 : - Riboflavine 10 mg
- Nicotinamide 10 mg
- Acide para-aminobenzoïque 1 mg
- Pyridoxine 5 mg
- 1 litre d'eau distillée

Solution V_2 : - Biotine
- Panthothenate de calcium 20 mg
- Thiamine 5 mg
- Acide folique 1 mg
- 1 litre d'eau distillée

Solution V_3 : - Inositol 10 mg
- Choline 10 mg
- Vitamine B12 10 mg
- 1 litre d'eau distillée

Milieu Vitamine 1 : 5 ml de la solution V_1/litre de milieu minimum
" " 2 : 5 ml de la solution V_2/litre de milieu minimum
" " 3 : 5 ml de la solution V_3/litre de milieu minimum

3.1.3. Sélection de mutants résistant à un inhibiteur

Parmi les inhibiteurs utilisés au laboratoire nous avons choisi de tester l'action de deux fongicides vis-à-vis de la germination et de la croissance d'*Aspergillus oryzae*.

- Le bénomyl (méthyl-1-butylcarbamoyl-2 benzimidazole carbamate) commercialisé par la Société Du Pont de Nemours sous le nom de Benlate.

- Le tridémorphe (N-tridécyl-2,6-dimethyl-morpholine) commercialisé par B.A.S.F. sous le nom de Calixin (BAS 2205 F).

Les spectres de sensibilité de ces deux molécules nous ont conduits à éliminer le tridémorphe qui n'agit sur *Aspergillus oryzae* qu'à de fortes doses (> 1000 ppm). Par contre, la sensibilité au bénomyl est effective à une dose supérieure à 1 ppm pour la souche 115.33 et à 5 ppm pour la souche 102.07. Nous avons donc choisi de cribler des résistants au bénomyl à une dose de 10 ppm de matière active dans le milieu PDA. Les suspensions conidiennes sont traitées avec 100 γ de NTG et étalées sur le milieu sélectif directement. Seuls les individus résistants au fongicide sont capables de croître dans ces conditions.

3.1.4. Sélection d'individus double-mutants

L'accumulation de deux mutations se fait la plupart du temps en ayant recours à deux étapes de mutagénèse. En effet, l'apparition d'un double-mutant (double auxotrophe ou auxotrophe et résistant) est un évènement génétique rare. Chez *A. oryzae*, nous avons tenté d'obtenir des auxotrophes marqués par une résistance à un inhibiteur quelconque. Après avoir évalué le pourcentage de germination des conidies des auxotrophes, nous avons constaté que ceux-ci se comportent vis-à-vis du bénomyl comme le parent dont ils sont issus. La dose de 100 γ de NTG donne de plus, toujours le même pourcentage de survie, c'est donc elle qui a été conservée. Les conidies mutagénisées sont étalées sur le milieu sélectif. Il faut toutefois s'assurer que tout individu se développant alors sur ce milieu a bien conservé son auxotrophie d'origine.

3.1.5. Sélection de mutants possédant des taux de toxine modifiés

Enfin, nous avons entrepris la recherche des mutants non producteurs d'acide α-cyclopiazonique à partir de la souche productrice, et inversement des mutants producteurs de la toxine à partir de la souche non productrice. Nous avons envisagé aussi la possibilité de sélectionner des souches hyperproductrices à partir de la souche productrice. Nous avons alors traité des suspensions conidiennes de deux souches avec une dose de 100 γ de nitrosoguanidine. Ces conidies sont ensuite étalées sur PDA gélosé puis clonées sur PDA après 24 heures de germination à 23°C.

Chacun des thalles obtenu est testé quant à son aptitude à produire ou non l'acide α-cyclopiazonique grâce à des cribles mis au point au cours de ce travail et détaillés ultérieurement.

3.2. ANALYSE PAR LA RECOMBINAISON MITOTIQUE

3.2.1. Utilisation des anastomoses végétatives

3.2.1.1. Observation des anastomoses végétatives

Nous avons testé tout d'abord l'aptitude des deux souches sauvages à s'anastomoser. Pour cela nous avons semé des conidies de chacune des deux souches à la surface de fragments de cellophane déposés sur des lames de PDA gélosé. La cellophane permet le maintien des filaments mycéliens dans un même plan, favorisant leur rencontre et éventuellement la formation des anastomoses. Après 24 heures d'incubation à 23°C et en présence d'humidité suffisante, nous avons recherché les anastomoses entre filaments sous le microscope.

3.2.1.2. Synthèse de thalles prototrophes

Plusieurs techniques ont été utilisées pour réaliser des hétérocaryons "forcés" entre souches présentant des exigences nutritionnelles différentes.

a) Méthode des mélanges de conidies

A partir de thalles jeunes des deux souches d'auxotrophies complémentaires à confronter, nous avons préparé des suspensions conidiennes titrant 10^6 conidies par ml et pratiqué le mélange des deux types de conidies parentales en proportions égales. Une goutte de ce mélange est déposé au centre d'une feuille de cellophane circulaire placée sur le PDA gélosé. Après 24 heures d'incubation à 23°C, les cellophanes avec les jeunes cultures sont transférées sur le milieu minimum. Seuls les thalles prototrophes se développent alors. Un témoin de chacune des suspensions isolée est aussi maintenu dans les mêmes conditions.

b) Méthode des boutures cubiques

Sur des jeunes thalles provenant de deux souches différentes, sont prélevées des boutures qui sont placées côte à côte au centre d'une feuille de cellophane placée sur du PDA gélosé. Après 24 heures d'incubation à 23°C, la cellophane est transférée sur le milieu minimum. Des thalles prototrophes se développent au point de contact des boutures.

c) Méthode des semis linéaires

Cette technique consiste à placer côte à côte sur une feuille de cellophane déposée sur le PDA, deux fils de coton de 30 mm de longueur, chacun d'eux ayant été trempé pendant 20 minutes dans des suspensions conidiennes des souches à confronter. Après 24 heures d'incubation à 23°C, la cellophane est transférée sur milieu minimum. Des secteurs prototrophes à croissance rapide apparaissent à un endroit quelconque de la zone de contact entre les filaments des deux souches confrontées.

3.2.1.3. Conclusion

Les observations faites à la suite de l'utilisation de ces trois techniques nous ont conduits à travailler essentiellement avec celle dite "des fils" (semis linéaires). Dans ces conditions l'apparition des secteurs prototrophes est fréquente et se produit au bout de 10 jours de maintien en confrontation. Avant de prélever ces secteurs nous attendons l'apparition de la sporulation.

3.2.2. Utilisation de la fusion de protoplastes

Certaines souches présentent des difficultés à s'anastomoser et ne donnent jamais naissance à des thalles sur milieu minimum. Afin de contourner ce problème, nous avons fait appel aux techniques d'obtention de protoplastes et de fusion de ceux-ci.

3.2.2.1. Conditions d'obtention de protoplastes

Les conditions d'obtention de protoplastes sont très variables selon les organismes, mais elles répondent toutes à un même schéma général. Pour nos souches nous avons utilisé la technique mise au point par MALLARD (44) sur *Aspergillus oryzae*. Pour cela, 0,1 à 0,3 g d'un mycélium âgé de 20 à 24 heures sont prélevés à la surface d'un milieu PDA recouvert d'une cellophane et mis en incubation durant cinq heures dans un complexe lytique composé de 5 ml d'un tampon phosphate 0,1 M à pH 6 contenant du KCl 0,6 M, d'acide citrique 0,05 M et de 5% de cytohélicase. Nous avons utilisé la cytohélicase d'une part parce qu'elle était disponible dans notre laboratoire, d'autre part parce qu'elle est couramment utilisée pour l'obtention de protoplastes chez d'autres champignons. Après les cinq heures d'incubation agitée à 23°C, les protoplastes sont recueillis par filtration sur verre fritté de porosité n° 2. Afin d'éliminer le complexe lytique, nous effectuons deux centrifugations successives en présence de tampon

phosphate 0,1 M - KCl 0,6 M. Le culot est repris dans la même solution tampon. Le nombre de protoplastes est évalué à l'hématimètre. Des dilutions et des étalements de ces protoplastes sur PDA + 30 % de saccharose sont effectuées pour déterminer leur taux de régénération.

Le nombre de protoplastes obtenus et leur taux de régénération étaient convenables pour réaliser une fusion.

3.2.2.2. Fusion des protoplastes

Pour réaliser cette fusion, nous avons utilisé la technique de MALLARD (44) Les protoplastes obtenus à partir de souches mutantes aux exigences différentes sont réunis dans un tube à centrifugation à raison d'environ 10^6 protoplastes par mutant. Ils sont ensuite centrifugés pendant 15 mn à 3000 t/mn puis remis en suspension dans 1 ml d'une solution fusiogène préalablement portée à 30°C, composée de 3% de polyéthylène-glycol (PM6000),de 0,01 % de $CaCl_2$ et de 0,05 M de glycine. Le pH de cette solution a été ajusté à 7,5 avec NaOH 0,01 N. L'incubation dans cette solution s'effectue pendant 15 minutes à 30°C. Passé ce temps une dilution 5 fois dans une solution hypertonique de NaCl 0,6 M est pratiquée avant de centrifuger à nouveau 15 minutes à 3000 t/mn. Le culot est alors repris dans 4 ml d'une solution NaCl 0,7 M. Un étalement dense est alors effectué sur milieu minimum additionné de 30 % de saccharose afin de rechercher les produits de la fusion. Des protoplastes non traités par la solution fusiogène et ayant subi le même protocole expérimental, nous ont servi de témoins.

3.3. MISE EN EVIDENCE DE LA PRODUCTION D'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE

3.3.1. Extraction de l'αCA

Pour une analyse immédiate de métabolites fongiques, la première étape consiste en la recherche de méthodes d'extraction simples. Elles permettent de réaliser le transfert d'un soluté initialement contenu dans une phase solide ou liquide, vers un solvant non miscible au premier milieu. Dans notre cas, où l'on extrait une solution par un solvant, il s'agit d'une extraction liquide-liquide. Le principe en est fondé sur la distribution d'un soluté donné entre les deux solvants en fonction de sa solubilité dans chacun d'entre eux. Pour extraire l'acide α-cyclopiazonique à partir de nos souches, nous avons utilisé la technique décrite par Le BARS (38) et nous l'avons adaptée aux exigences de notre organisme *Aspergillus oryzae*. La production d'αAC est réalisée dans les

conditions données dans le chapitre précédent. A partir de ces cultures, 400 ml de milieu de chacune des souches sont recueillis puis filtrés sur verre fritté de porosité n° 2. Leur pH est ajusté à pH 3 avec HCl (50 %). A ce volume de filtrat sont ajoutés 4 volumes d'un mélange méthanol-chloroforme en proportion 1-4. Après agitation, le mélange est mis dans une ampoule à décanter pendant le temps nécessaire pour la séparation de la phase aqueuse et de la phase chloroforme. La phase chloroforme est recueillie dans une bouteille brune contenant du Na_2SO_4 anhydre pour séchage pendant une nuit. Après filtration, la phase chloroforme est évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif (ROTAVAPOR). Le poids d'extrait de chaque souche est évalué avec une balance de précision.

3.3.2 - Caractérisation de l'acide α-cyclopiazonique dans les extraits bruts

3.3.2.1. Chromatographie en couche mince

D'après MAHUZIER (43), le principe de cette chromatographie a été décrit en 1938 par ISMAILOV et SCHRAIBER. Mais ce n'est qu'à partir de 1956 que les travaux de STAHL la firent connaître. Depuis cette date, elle a connu un développement considérable. La simplicité du matériel utilisé, sa rapidité, et les très bonnes séparations qu'elle permet, expliquent qu'en quelques années, elle se substitua en bien des domaines à la chromatographie sur papier. Elle se prête à la séparation de substances aussi différentes que les ions minéraux, les complexes organo-minéraux et les complexes organiques. Elle peut selon le procédé utilisé, s'appliquer à des quantités allant de quelques microgrammes au gramme.

Le BARS (38) a utilisé et décrit une technique de chromatographie en couche mince pour mettre en évidence l'acide α-cyclopiazonique chez *Penicillium camemberti*. Nous l'avons mise à profit pour caractériser nos différents extraits bruts et y révéler la présence ou non d'αCA.

Pour cela, nous avons repris nos différents extraits dans un petit volume de chloroforme et chaque échantillon est déposé à l'aide de micropipettes sur une même ligne à deux centimètres du bord d'une plaque de chromatographie (gel de silice Merck 60F.254) préalablement imprégnée d'acide oxalique 0,4N et séchée, ceci pour éviter les phénomènes de diffusion. La plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve fermée au fond de laquelle se trouve un solvant de migration composé de 4 volumes de chloroforme et de 1 volume d'isobutylméthyl-cétone.

La migration dure environ deux heures pour une plaque de 20 centimètres. Lorsque le front du solvant atteint le bord supérieur de la plaque, il est repéré avec précaution et la plaque est séchée rapidement à l'air. Le réactif d'Ehrlich, composé de 4-diméthylaminobenzaldehyde 10% dans de l'acide chlorhydrique pur et dilué extemporanément quatre fois dans l'acétone, est vaporisé à la surface du gel. L'apparition d'un spot bleu-violet à un Rf de 0,71 révèle la présence de l'αCA. Un témoin avec la toxine purifiée est pratiqué simultanément. Nous remercions à cet effet le Professeur OHMONO de l'Université de Tsukaba au Japon et le Professeur GORST-ALLMAN du National Chemical Research Laboratory à Pretoria pour les extraits purs qu'ils ont bien voulu nous faire parvenir.

3.3.2.2. Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet

L'absorption dans le visible et l'ultra-violet est associée à des excitations électroniques (14). Les spectres d'absorption, enregistrés dans la région comprise entre le visible et l'ultra-violet, présentent des bandes larges plutôt que des pics étroits du fait de la superposition de nombreuses transitions et vibrations électroniques. Les bandes d'absorption sont caractérisées par un maximum pour une longueur d'onde donnée. La forme du spectre d'absorption peut servir à l'identification d'une substance. Le spectrophotomètre est constitué d'une source lumineuse, d'un réseau de diffraction et d'un détecteur photoélectrique lié à un instrument de mesure. Le réseau de diffraction et la longueur de la fente permettent de régler la dispersion des longueurs d'onde à travers l'échantillon. L'échantillon mis en solution est comparé à un témoin contenant le solvant pur. Nous avons travaillé avec un spectrophotomètre de type BECKMAN (R) model 25.

Nos extraits secs sont chacun repris dans du méthanol distillé, à raison de 14,25 mg d'extrait par ml de méthanol suivis d'une dilution 500 fois de l'échantillon, soit une concentration finale de $2,85.10^{-2}$ mg d'extrait par ml de solvant.

Nous enregistrons les spectres d'absorption de ces échantillons dans des cuves en quartz de 4 ml (L = 1 cm) pour des longueurs d'onde comprises entre 200 et 400 nm. A chaque pic du spectre, nous notons la densité optique correspondante.

3.3.2.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.), conduit à des certitudes structurales qui ne pourraient être acquises que très difficilement par d'autres méthodes. Cette technique permet de plus une analyse quantitative des extraits (13).

Le principe de la spectrométrie de R.M.N. est le suivant :

L'échantillon à étudier est introduit dans un champ magnétique $\vec{H}o$ continu et orienté suivant un axe oz. Un deuxième champ $\vec{H}1$ sinusoïdal et orienté perpendiculairement au précédent suivant un axe oy, provoque la résonance. Or, tout mouvement sinusoïdal peut être composé en deux mouvements circulaires uniformes de sens opposés et de même vitesse. Dans le cas du champ $\vec{H}1$, ces deux mouvements circulaires se produisent dans un plan perpendiculaire à oz soit le plan xoy. L'une des composantes correspondant à un mouvement de même sens que la rotation du vecteur magnétisation, la résonance magnétique a lieu lorsque les deux fréquences sont les mêmes. Cette résonance produit une absorption d'énergie intéressant donc une seule composante circulaire du mouvement sinusoïdal. Ceci a pour conséquence que la magnétisation correspondant au champ $\vec{H}1$ ne se situe plus obligatoirement sur l'axe oy. Cette vibration présente après absorption deux composantes selon oy et selon ox. Une bobine réceptrice placée selon ox est donc soumise à un champ sinusoïdal qui y induit un courant électrique qui est ensuite amplifié et enregistré.

Les applications pratiques de la R.M.N. portent sur l'analyse structurale d'une molécule organique, mais permettent également une analyse quantitative.

a) L'analyse structurale porte, d'une part, sur la mesure des déplacements chimiques et d'autre part, sur la détermination des constantes de couplage. En effet, les déplacements chimiques dépendent de l'environnement électronique du noyau. Plus celui-ci est dense, plus le déplacement chimique exprimé en ppm est faible.

- Exemple : acétyl : $CH_3 - \underset{\underset{O}{\|}}{C}$ - a un déplacement chimique noté

δ compris entre 1,80 et 2,60 ppm

D'autre part, en ce qui concerne les constantes de couplage, on sait que dans la résonance magnétique du proton, l'observation de la multiplicité des noyaux est également importante. Par exemple, un groupement méthyle porté par

un azote, un oxygène ou un carbone quaternaire, donne des pics uniques ou singulets. Ce même groupement lié à un carbone tertiaire, se présentera sous forme d'un doublet. Par conséquent, l'acétyl $CH_3 - \underset{\underset{O}{\|}}{C} -$ est représenté par un singulet, qui a un déplacement chimique δ compris entre 1,80 et 2,60 ppm.

Pour réaliser ce travail, nous nous sommes servis d'un appareil PERKIN-ELMER (R32) à 90 MHz. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm (10^{-6}) par rapport au pic de tétraméthylsilane (TMS) qui sert de référence interne. Nos extraits secs sont repris dans 0,5 ml de chloroforme deutérié avant d'être analysés en R.M.N. L'interprétation des spectres connaissant la structure chimique de la molécule permettra de détecter avec précision la présence ou non de l'αCA dans les extraits bruts.

b) Une analyse quantitative est possible en introduisant dans nos extraits une concentration connue d'un composé simple donnant un singulet en R.M.N. Nous avons choisi le nitrométhane ($CH_3\ NO_2$) qui a une bonne solubilité dans le chloroforme et donne un pic singulet isolé donc facilement identifiable. Le déplacement chimique de ce groupement introduit comme témoin est δ = 4,33 ppm distinct de celui du groupement acétyl de l'αCA qui est δ = 2,49 ppm et de tous les autres pics provenant de l'αCA.

Connaissant la molarité de la solution en $CH_3\ NO_2$, la mesure du rapport entre les hauteurs des pics du groupement CH_3CO de l'αCA et de $CH_3\ NO_2$ suffit à évaluer la quantité d'αCA contenue dans chaque extrait. Cette technique nous permettra de comparer des souches ayant divers niveaux de production. La précision de cette mesure est de l'ordre de 10%.

DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE LA PRODUCTION D'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE CHEZ *ASPERGILLUS ORYZAE*. RECHERCHE D'UN CRIBLE BIOLOGIQUE, SELECTION DE MUTANTS

CHAPITRE I : ETUDE DE LA PRODUCTION D'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE

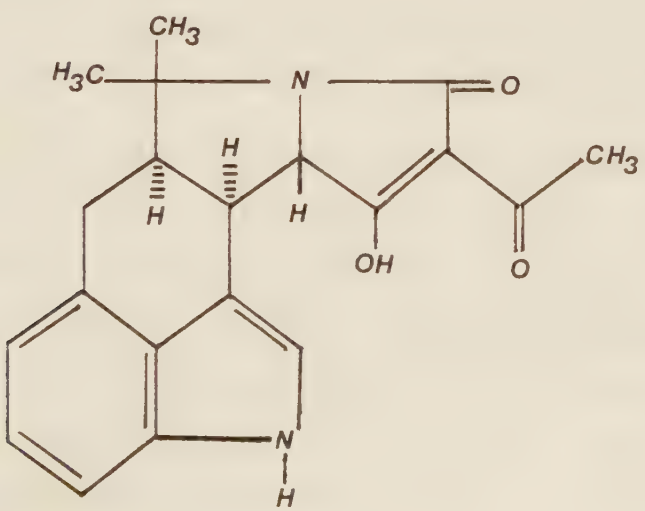
1.1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE CONCERNANT LA PRODUCTION D'αCA

1.1.1. Mise en évidence de la production d'αCA

La production d'acide α-cyclopiazonique a été mise en évidence pour la première fois en 1968 par HOLZAPFEL (16), chez *Penicillium cyclopium*, d'où le nom donné à cette toxine. Au cours de cette même année, WILSON et ses collaborateurs (73) ont pu isoler cette substance à partir de grains de blé infectés par *Penicillium cyclopium* qui avaient provoqué des convulsions chez des animaux de ferme. Par la suite, la présence d'acide α-cyclopiazonique a été montrée en 1973 par OHMONO (51) chez *Aspergillus versicolor*, en 1977 par ORTH (52) chez *Aspergillus oryzae* et par LUK (41) chez *A. flavus*, enfin, en 1979 par LE BARS (37) chez *Penicillium camemberti*.

1.1.2. Identification de l'αCA

En 1968, par ses travaux de recherche chimiques et physico-chimiques, HOLZAPFEL (16) a montré que l'acide α-cyclopiazonique est un acide acyltétramique et que sa structure chimique est la suivante :



1.1.3. Biosynthèse de l'αCA

En 1971, HOLZAPFEL et WILKINS (18) au cours de leurs travaux sur la production d'acide α-cyclopiazonique chez *Penicillium cyclopium* ont conclu d'une part que cette toxine dérivait de l'association entre un acide aminé : le tryptophane, et une unité isoprène issue de l'acide mévalonique : le pyrophosphate de diméthylallyl (DMAPP) donc de divers produits du métabolisme primaire et d'autre part que l'acide β-cyclopiazonique était la dernière étape avant la formation de l'acide α-cyclopiazonique.

En reprenant les travaux de divers auteurs, nous avons résumé sur la figure n° 1 l'ensemble des étapes de la biosynthèse de l'acide α-cyclopiazonique connues à ce jour.

L'acide α-cyclopiazonique est le seul acide tétramique dont la biosynthèse a été élucidée en détail. L'originalité de cette biosynthèse en comparaison avec celle d'autres alcaloïdes est que l'isoprénylation n'intervient pas en dernière étape. En effet, cette isoprénylation prend place au niveau du CAAtrp (cycloacétoacétyl-L-tryptophanyl), directement dérivé du tryptophane et de l'acétyl CoA, pour fournir l'acide β-cyclopiazonique (McGRATH, 1973) (46).

En 1976, McGRATH (47) démontre que l'introduction du DMAPP au niveau du carbone 4 du tryptophane catalysée par la cycloacétoacétyltryptophanyl-diméthylallyl transferase conduit au CAAtrp (fig. 2). Le CAAtrp sous l'action d'une autre enzyme, la β-cyclopiazonate synthétase, donne l'acide β-cyclopiazonique.

Avant même que ne soient connues ces étapes d'isoprénylation, dont les mécanismes chimiques posent encore un problème, SCHABORT en 1971 (61) mettait à jour la cyclisation oxydative du βCA sous l'influence de la β-cyclopiazonate oxydocyclase conduisant à la synthèse de l'acide α-cyclopiazonique.

Les enzymes responsables de ces deux dernières étapes ont été isolées pour poursuivre une étude de leurs propriétés physiques et de leur activité catalytique. L'ensemble des travaux que nous venons de résumer confortent l'idée que les mécanismes normaux de synthèse des protéines mis en jeu dans le métabolisme primaire sont également nécessaires pour le métabolisme secondaire (McGRATH, 1977) (48). Une étude, d'une part, du développement métabolique de *Penicillium cyclopium* durant la production d'αCA, d'autre part, de quelques facteurs impliqués dans le contrôle de cette synthèse, a contribué grandement à l'accroissement des

Figure 1

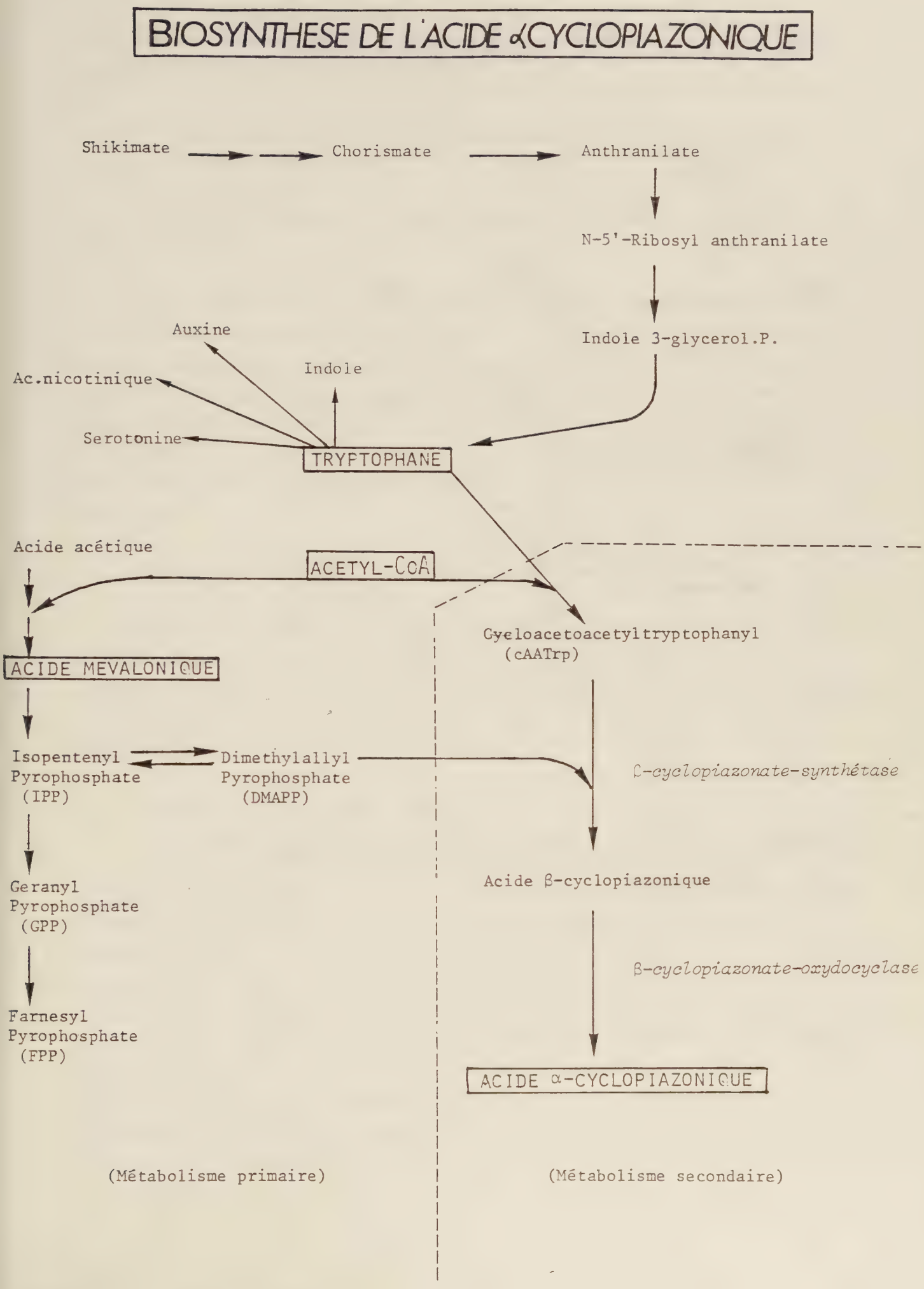
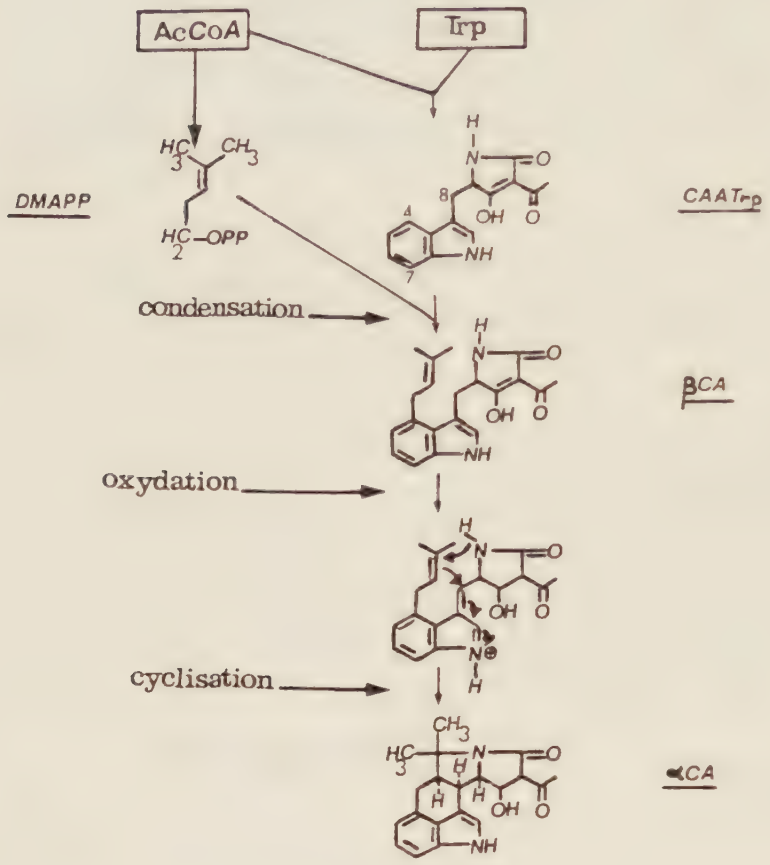

BIOSYNTHESE DE L'ACIDE αCYCLOPIAZONIQUE
Shikimate
Chorismate
Anthranilate
N-5'-Ribosyl anthranilate
Indole 3-glycerol.P.
Auxine
Indole
Ac.nicotinique
Serotonine
TRYPTOPHANE
Acide acétique
ACETYL-CoA
Cycloacetoacetyltryptophanyl
(cAATrp)
ACIDE MEVALONIQUE
Isopentenyl
Pyrophosphate
(IPP)
Dimethylallyl
Pyrophosphate
(DMAPP)
C-cyclopiazonate-synthétase
Geranyl
Pyrophosphate
(GPP)
Acide β-cyclopiazonique
β-cyclopiazonate-oxydocyclase
Farnesyl
Pyrophosphate
(FPP)
ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE
(Métabolisme primaire)
(Métabolisme secondaire)

Figure 2

BIOSYNTHESE DE L'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE (α-CA)



CONVERSION DU CAATrp ET DU DMAPP EN ACIDE β-CYCLOPIAZONIQUE (βCA) ET CONVERSION DU βCA EN αCA.

connaissances concernant le déclenchement de l'utilisation de certains produits du métabolisme primaire pour la biosynthèse de l'αCA (19).

1.1.4. Influence de différents facteurs sur la production de l'acide α-cyclopiazonique

a) Effet de l'addition des précurseurs sur la production de l'acide α-cyclopiazonique :

En 1977, NEETHLING et McGRATH (50) ont montré chez *Penicillium cyclopium* que d'une part, l'addition de tryptophane au milieu de culture provoque une chute de la production de l'acide α-cyclopiazonique, et que d'autre part cette chute est due à une rétroinhibition, c'est-à-dire que le tryptophane exogène inhibe la tryptophane synthétase. Par ailleurs, ils ont montré que l'addition d'acide mévalonique au milieu de culture n'a aucun effet sur la production de cette toxine, alors que l'addition de DMAPP provoque une diminution de sa production.

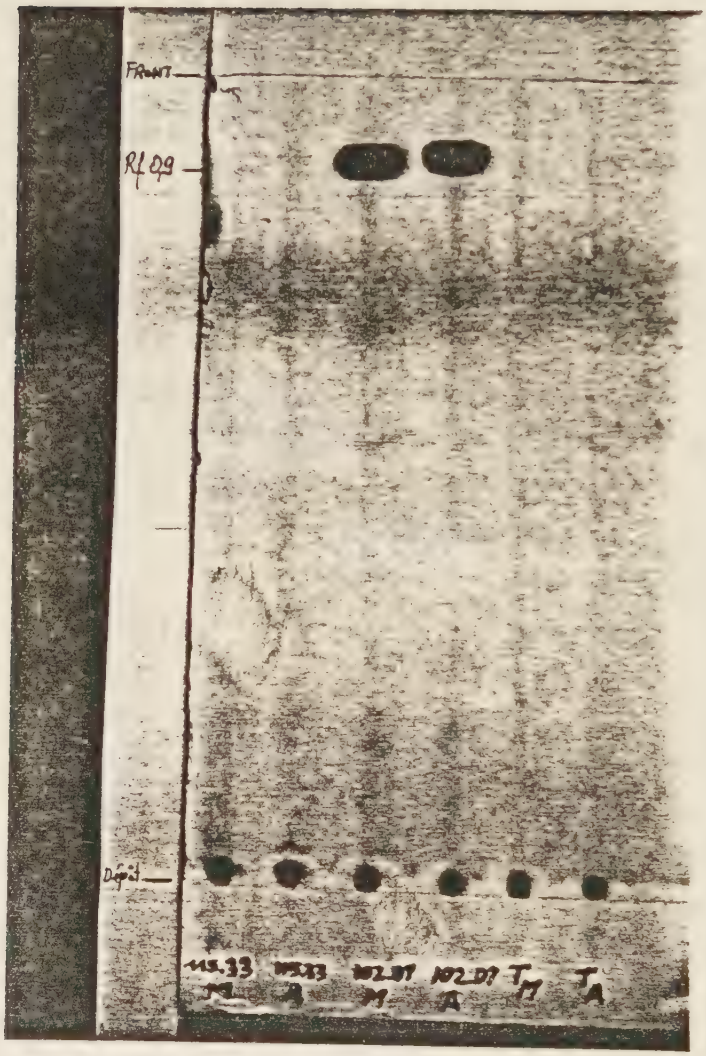
b) Effet du pH sur la production de l'acide α-cyclopiazonique :

En 1977, les mêmes auteurs ont montré que sur un milieu de culture acide la β-cyclopiazonate oxidocyclase, permettant la transformation du βCA en αCA, se trouve inhibée. On observe alors une accumulation de l'acide β-cyclopiazonique et donc une diminution de la production d'acide α-cyclopiazonique. A pH 5,5, la production de ce dernier se fait normalement.

c) Effet de quelques ions métalliques :

En 1971, SCHABORT (61) a montré qu'une faible concentration d'ions Zn^{++} ou Fe^{++} provoque une diminution du pH du milieu et donc une chute de la production d'acide α-cyclopiazonique. En effet, en 1977, NEETHLING et McGRATH (50) ont observé que les ions Zn^{++} et Fe^{++} sont essentiels pour la croissance du champignon et que la production d'acide α-cyclopiazonique est constante en présence de 2,7 à 26 µM de Fe^{++} et de 1,2 à 24,5 µM de Zn^{++} ; en dessous de 2,7 µM de Fer et de 1,2 µM de Zinc, la croissance du champignon et la production de l'acide α-cyclopiazonique diminuent nettement. De plus, la même équipe a montré que les ions Mn^{++} provoquent des changements considérables de la cycloacétoacéthyl-tryptophanyl dimethylallyl transférase en entraînant une inhibition de l'activité et de ce fait la conversion du CAAtrp et du DMAPP en acide β-cyclopiazonique est impossible.

Photo n° 3 - Révélation de l'αCA dans les extraits bruts par chromatographie en couche mince



1.2. DETECTION DE L'αCA DANS LES EXTRAITS DE MILIEUX DE CULTURE

1.2.1. Chromatographie en couches minces de silice

Les résultats obtenus en 1979 par LE BARS (38) avec des extraits réalisés à partir de cultures de *Penicillium camemberti*, ont montré que la présence de l'acide α-cyclopiazonique se caractérise par l'apparition sur la plaque de chromatographie d'une tache bleu-violet à la lumière du jour. Cette tache se situe à un Rf de 0,71.

Nous avons noté que les extraits purifiés de l'acide α-cyclopiazonique fournis par les Professeurs OHMOMO et GORST-ALLMAN ainsi que les extraits de la souche 102.07 ont donné sur la plaque de chromatographie cette tache bleu-violet avec un Rf allant de 0,75 à 0,90. Par contre, les extraits de la souche 115.33 et ceux du milieu de culture M non ensemencé, n'ont jamais révélé cette tache. Celle-ci semble donc être caractéristique de l'acide α-cyclopiazonique. Donc, en utilisant la chromatographie sur silice en couches minces, qui ne permet pas un dosage précis des molécules, il est possible de détecter l'acide α-cyclopiazonique dans un extrait brut pratiqué sur un filtrat de culture (photo n° 3).

1.2.2. Spectrométrie dans l'ultra-violet

La spectrométrie ultra-violette repose sur l'existence de transitions entre niveaux d'énergie électroniques. En effet, un électron sous l'influence d'une radiation lumineuse passe d'une orbitale à une autre d'énergie plus élevée. Il y a donc absorption d'énergie. Les énergies mises en jeu varient en fonction de la longueur d'onde.

La spectrométrie ultra-violette donne de bons résultats, si le composé à étudier a un spectre à structure fine. L'identification d'un composé peut être faite par l'étude du maximum ou des épaulements d'un spectre.

L'utilisation de cette méthode permet d'apporter des informations complémentaires et plus précises sur la présence ou l'absence de la molécule d'αCA dans nos extraits bruts. L'acide α-cyclopiazonique est soluble dans le méthanol, donc chaque extrait sec est repris dans du méthanol distillé de façon à obtenir des échantillons à une concentration finale de $2,85.10^{-2}$ mg d'extrait par ml de méthanol.

Nous enregistrerons les spectres UV dans le méthanol qui n'absorbe pas entre 200 nm et 400 nm (13). Nous identifions aussi le spectre d'extraits purifiés d'αCA en guise de témoin. Nous avons résumé les résultats dans le tableau n° 5. Les différents spectres obtenus sont présentés sur la figure n° 3.

TABLEAU N° 5 - Résultats de la spectrométrie ultra-violette

Caractéristiques / Extraits	Maximum d'absorption en nm	Densité optique
Acide α-cyclopiazonique	220 nm 280 nm	0,91 0,50
La souche 102.07	220 nm 245 nm 280 nm	0,98 0,77 0,48
La souche 115.33	210 nm 260 nm	0,64 0,27

Des résultats obtenus nous pouvons tirer plusieurs informations :

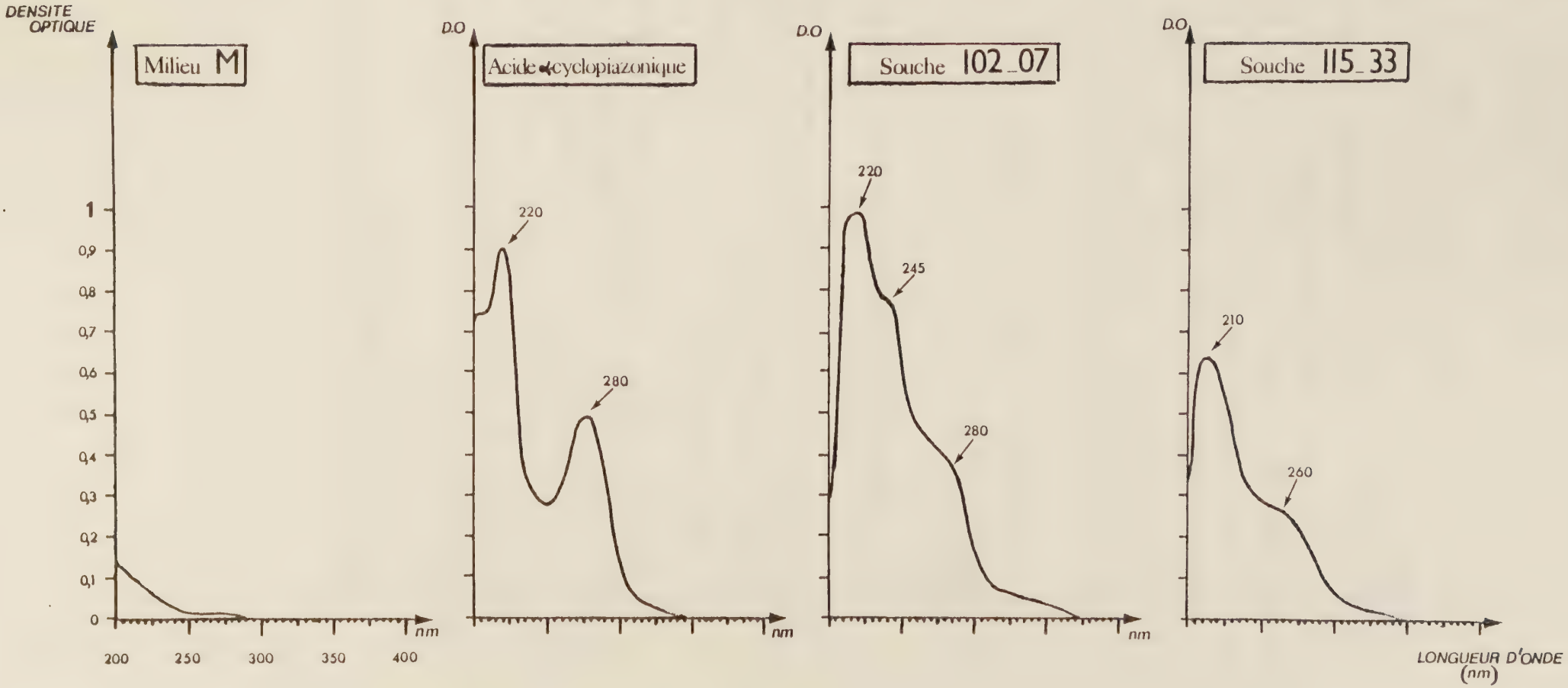
1) Le spectre de l'αCA purifié présente deux maxima à 220 nm et à 280 nm. Les densités optiques correspondantes sont sensiblement le double l'une de l'autre. Les coefficients d'extinction respectifs sont $\varepsilon_1 = 10700$ et $\varepsilon_2 = 5350$.

2) Le spectre des extraits bruts de la souche 102.07 présente plusieurs pics dont les deux mêmes maxima à 220 nm et à 280 nm présentent des D.O à peu près double l'une de l'autre. Les coefficients d'extinction respectifs sont $\varepsilon'_1 = 11500$ et $\varepsilon'_2 = 5600$.

3) Le spectre obtenu à partir des extraits de la souche 115.33 ne présente pas les maxima caractéristiques de l'αCA. Nous concluons que cette souche ne produit pratiquement pas d'αCA.

L'ensemble de ces résultats confirme ceux obtenus par la chromatographie en couche mince.

Figure 3 : SPECTRES D'ABSORPTION DANS L'ULTRA_VIOLET



De plus, il faut noter que HOLZAPFEL en 1968 (16) a décrit le spectre UV d'un extrait contenant de l'αCA à partir de cultures de *Penicillium cyclopium* comme présentant des maxima d'absorption à 225 nm et 284 nm. La même année, SOBER (67) décrit le spectre UV du tryptophane montrant des maxima d'absorption à 221 nm et 282 nm. On peut donc penser que c'est la présence de la molécule de tryptophane dans le squelette carboné de l'αCA qui donne le spectre UV obtenu ci-dessus pour cette toxine. Pourtant, cette technique n'est pas très précise puisque d'autres groupements peuvent absorber à ces mêmes longueurs d'onde. Ainsi, HAMON (13) montre que des maxima à 220 nm et 280 nm peuvent être engendrés respectivement par les groupements $(C = C)_2$ et $C = O$. Or, le premier de ces groupements n'existe pas dans la molécule d'αCA.

Pour apporter une preuve définitive de la présence d'αCA dans nos extraits, nous avons été amenés à utiliser une autre technique : la résonance magnétique nucléaire des protons.

1.2.3. Résonance magnétique nucléaire des protons : RMN ^1H

La résonance magnétique nucléaire des protons permet l'analyse structurale précise des molécules mais permet aussi une évaluation quantitative de celles-ci.

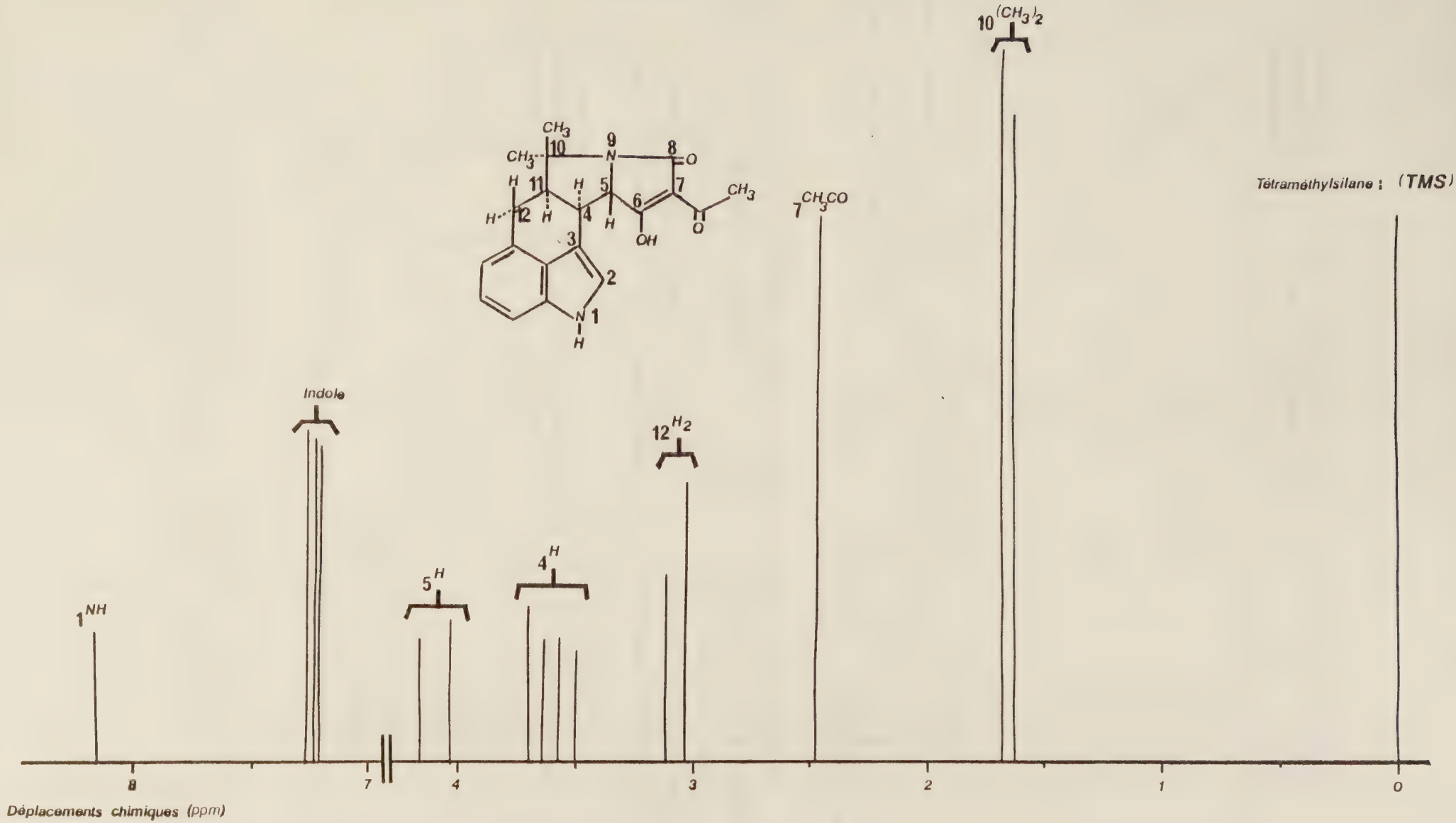
a) Analyse structurale :

Le spectre RMN ^1H de 0,6 mg d'un extrait purifié d'acide α-cyclopiazonique (échantillon fourni par le Professeur OHMOMO) présente plusieurs pics. Pour identifier les pics correspondant aux groupements chimiques constituant l'acide α-cyclopiazonique, nous avons utilisé les résultats de HOLZAPFEL (16). Le spectre comporte sept signaux et pour localiser les groupements leurs correspondant, nous avons adopté la numérotation des atomes décrite par HOLZAPFEL (fig. n° 4).

Ainsi les pics qui ont été identifiés sont les suivants :

Figure 4 : SPECTRE RMN DE L'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE

(solvant $CDCl_3$)



Nature du pic	Déplacement chimique δ en ppm	Groupement correspondant
doublet	1,61	$_{10}(CH_3)_2$
singulet	2,49	$_{7}CH_3CO^2$
doublet	3,04	$_{12}H_2$
quadruplet	3,50	$_{4}H$
doublet	4,04	$_{5}H$
triplet	7,21	INdole
singulet	8,16	$_{1}NH$

Nous avons alors mesuré les spectres des extraits bruts obtenus à partir des souches d'*A. oryzae* 102.07 et 115.33.

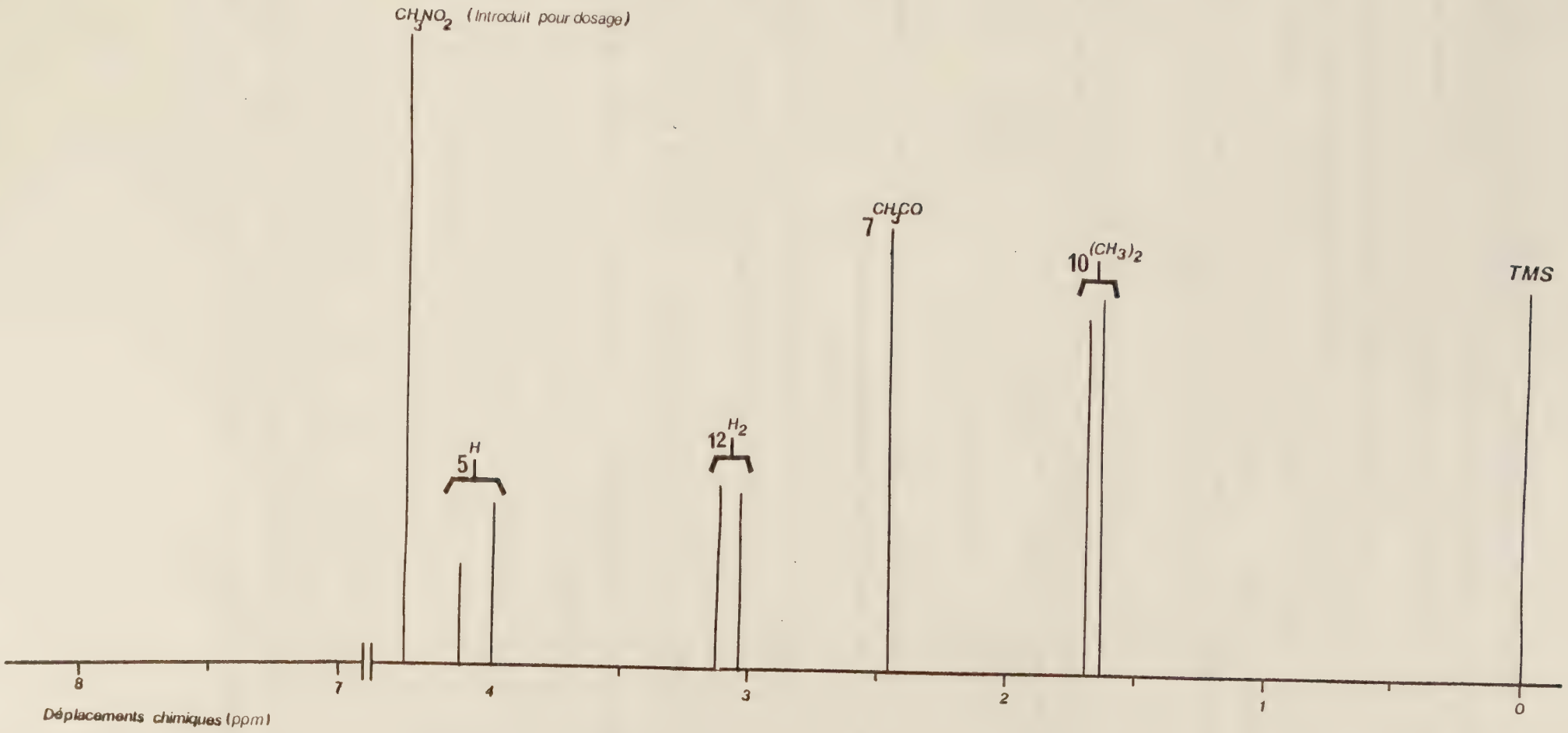
Nos extraits ne sont pas purifiés donc le spectre fait apparaître de très nombreux pics correspondant à toutes les substances qu'ils contiennent autres que l'αCA. Toutefois dans ce spectre d'un extrait brut de la souche 102.07 on peut repérer plusieurs des pics caractéristiques de l'αCA que nous décrivons ci-dessous. Le spectre correspondant est donné dans la figure n° 5.

Nature du pic	Déplacement chimique δ en ppm	Groupement correspondant
doublet	1,62	$_{10}(CH_3)_2$
singulet	2,47	$_{7}CH_3CO$
doublet	3,03	$_{12}H_2$
doublet	4,00	$_{5}H$

Plusieurs pics caractéristiques de l'αCA sont masqués par ceux d'autres produits contenus dans l'extrait et en particulier ceux des protons du noyau indole.

Figure 5 : SPECTRE RMN DE **102.07**

(solvant $CDCl_3$)



Si nous réalisons maintenant le spectre RMN ^{1}H de la souche 115.33, nous constatons qu'aucun pic caractéristique de l'αCA n'est détectable. Ceci est vrai aussi pour un extrait obtenu à partir d'un milieu M non ensemencé.

En conclusion, l'apparition sur le spectre de la souche 102.07 de plusieurs pics caractéristiques de l'acide α-cyclopiazonique que nous ne retrouvons pas sur les spectres de la souche 115.33 et du milieu M non ensemencé, ne peut être expliquée que par la présence de cette toxine dans l'extrait brut de cette souche. Nous pouvons donc affirmer que la souche 102.07 produit effectivement l'αCA, alors que la souche 115.33 ne la produit pas.

Ceci nous a permis, de plus, de caractériser divers mutants modifiés quant à leur capacité à produire l'αCA, obtenus après mutagenèse sur ces deux souches. Le tableau n° 6 décrit leur spectre.

b) Analyse quantitative :

Un dosage de la quantité d'αCA produite par diverses souches a été décrit dans le chapitre III de la première partie.

Pour cela, nous avons introduit dans chaque extrait une concentration de $2,2 \times 10^{-2}$ M d'un composé témoin le $CH_3\ NO_2$. Le rapport des hauteurs des pics engendrés par ce groupement et par le groupement acétyl ($CH_3\ CO$) de l'αCA, nous permet de donner une estimation de la concentration d'αCA dans nos extraits. Le pic engendré par le $CH_3\ CO$ de l'αCA contenu dans l'extrait brut de la souche 102.07 a une hauteur de 7,8 cm (fig. n° 7), alors que celui de $CH_3\ NO_2$ a une hauteur de 11 cm.

Ainsi, on obtient un rapport de $\frac{7,8}{11}$, soit une concentration de $\frac{7,8}{11} \times 2,2 \times 10^{-2} = 1,56\ 10^{-2}$ M d'αCA. Nous connaissons le PM de l'αCA qui est 336.

Si la concentration d'αCA dans l'extrait est considérée comme molaire et que nous introduisons dans l'appareil la totalité de l'extrait dans 0,5 ml de chloroforme, nous aurons introduit 168 mg d'αCA. La quantité d'αCA réellement contenue dans cet extrait sera donc de : $168 \times 1,56.10^{-2} = 2,62$ mg.

Le poids d'extrait brut obtenu dans ce cas est de 45,5 mg pour la souche 102.07. Cet extrait renferme donc 5,7% d'acide α-cyclopiazonique.

TABLEAU N° 6 - Résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus en RMN ^{1}H pour nos deux souches mères et quelques mutants que nous avons isolés au cours de notre travail

Les pics caractéristiques de l'αCA	Souches mères		Souches mutantes				
	102.07	115.33	A partir de 102.07			A partir de 115.33	
			T50	TB500	32.1	NPP7	450
$_{10}(CH_3)_2$, δ = 1,61	δ=1,62		δ=1,61			δ=1,62	δ=1,62
$_{7}(CH_3CO)$, δ = 2,49	δ=2,47		δ=2,49			δ=2,47	δ=2,47
$_{12}(H_2)$, δ = 3,04	δ=3,03		δ=3,06			δ=3,04	δ=3,04
$_{4}(H)$, δ = 3,50			δ=3,50			δ=3,50	δ=3,51
$_{5}(H)$, δ = 4,04	δ=4,00					δ=4,00	δ=4,00
Indole δ = 7,21							
$_{1}(NH)$, δ = 8,16							
Quantité d'αCA présente dans l'extrait (en %)	5,7%	0%	8,2%	0%	0%	2%	0,6%

En conclusion, la détection de plusieurs pics caractéristiques de l'αCA, sur les spectres RMN ^{1}H donnés par des extraits obtenus à partir de souches différentes, nous permet de déterminer avec précision leur aptitude à produire l' αCA dans des conditions de culture définies.

La caractérisation par chromatographie en couche mince ou par l'établissement des spectres UV donne une bonne indication mais non une preuve définitive. Seule la RMN ^{1}H apporte cette preuve caractérisant directement la structure chimique de la molécule à mettre en évidence.

CHAPITRE II : RECHERCHE D'UN CRIBLE BIOLOGIQUE

Ayant acquis un certain nombre de connaissances précises sur les conditions de production et de caractérisation de l'acide α-cyclopiazonique, notre objectif premier a été de rechercher un crible biologique le plus simple possible permettant d'isoler facilement des individus qui ne produisent pas d'acide α-cyclopiazonique au sein d'une population produisant cette toxine.

2.1 - ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE CERTAINES TOXINES : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

De nombreux auteurs (34) déterminent la toxicité des extraits de divers champignons en utilisant les trois tests biologiques suivants :

- Inhibition de la croissance d'embryon de poulet.
- Inhibition de la multiplication cellulaire.
- Toxicité aïgue chez les souris.

Mais diverses études ont montré que la plupart des mycotoxines possèdent parallèlement à leurs pouvoirs toxiques, cancérigène, mutagène ou tératogène (6) des propriétés antimicrobiennes (5). Effectivement, en 1965 (68) STANTON et ses collaborateurs, ont montré que l'acide ténuazonique, appartenant à la même famille des acides acyltétramiques que l'acide α-cyclopiazonique, inhibe la croissance d'*Echerichia coli*, de *Bacillus subtilis*, de *Bacillus* sp. et de *Salmonella gallinarum*. En 1967, SUZUKI (69) a décrit des modifications de la croissance et de la structure cellulaire d'*E. coli* par de faibles concentrations de mitomycine produite par *Streptomyces caespitosus*. En 1975, REISS (58) a mis en évidence que *B. megaterium* et *B. strearothermophilus* sont sensibles à l'aflatoxine B1 produite par *Aspergillus flavus*, que *B. cereus mycoïdes* est sensible à l'ochratoxine A produite par *Aspergillus ochraceus*, et que *B. subtilis* est sensible à la patuline émise par *Penicillium patulum*. Enfin, en 1979, BOUTIBONNE (5) a mis en évidence l'activité antibactérienne, à des degrés divers, de plusieurs toxines fongiques excrétées par *Penicillium* sp., par *Aspergillus* sp., *par Fusarium* sp., et par des Basidiomycètes, vis-à-vis *B. thuringiensis* (Berliner) sérotype 1, qui est extrêmement sensible aux effets antagonistes des mycotoxines. Le même auteur (4) a démontré que l'effet de la zéaralénone produite par *Gibberella zeae* sur *B. thuringiensis*, se traduit par une hypertrophie et une multiplication des mésosomes et par une réduction de la multiplication cellulaire et un allongement bacillaire. L'ensemble de ces travaux nous ont incité à rechercher l'éventuelle activité antibiotique de l'acide α-cyclopiazonique vis-à-vis d'*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*.

2.2 - PROPRIETES BIOLOGIQUES DE L'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE

Le pouvoir antibiotique de l'acide α-cyclopiazonique a été recherché par la technique de l'antibiogramme.

Les effets antimicrobiens des filtrats de culture des souches d'*A. oryzae* sont mis en évidence par la méthode de diffusion en gélose nutritive mince contenant la souche de bactérie "test" après dépôt de pastilles de cellulose imbibées de filtrats de culture ou de la substance à tester. L'effet antibiotique est noté lorsqu'un halo d'inhibition de la croissance bactérienne apparaît autour des pastilles.

Nous avons utilisé deux bactéries "test" qui nous ont été fournies par l'Institut de Microbiologie d'Orsay :

- la souche HfR G6 de *E. coli* qui est histidine dépendante et sensible aux antibiotiques ;
- la souche 168 de *B. subtilis* qui est tryptophane dépendante et sensible aux antibiotiques.

Les milieux de culture sont : pour *E. coli* le milieu LB (annexe 2) et pour *B. subtilis* le milieu LB renfermant 0,1% de sulfate de magnésium.

2.2.1 - Effet des filtrats des milieux de culture sur la croissance de *E. coli* et de *B. subtilis*

Les filtrats de culture de trois semaines à 23°C sont recueillis et servent à imbiber des pastilles déposées sur les étalements bactériens (*E. coli* et *B. subtilis*). Le milieu de culture M non ensemencé maintenu trois semaines dans les mêmes conditions n'a aucun effet sur la croissance de l'une ou l'autre des bactéries "test".

Des filtrats de culture obtenus après trois semaines de croissance de la souche 115.33 donnent un halo très fin et flou autour des pastilles de un centimètre de diamètre moyen. Par contre, des filtrats de milieu après 3 semaines de culture de la souche 102.07 expriment un halo très net qui correspond à l'inhibition de la croissance de *E. coli* et de *B. subtilis* et dont le diamètre moyen est de 2,2 cm.

2.2.2 - Effet des extraits chimiques bruts

Nous avons réalisé le même test que précédemment, en utilisant cette fois-ci les extraits bruts obtenus à partir des milieux de culture de chacune des deux souches. Il s'est avéré que l'extrait réalisé à partir du milieu de culture M non ensemencé, ainsi que celui obtenu après trois semaines de culture de la souche 115.33 n'ont aucun effet sur la croissance de *E. coli* et de *B. subtilis*. Par contre, l'extrait venant d'une culture de 3 semaines de la souche 102.07 et un échantillon pur d'acide α-cyclopiazonique expriment chacun un halo net dont les diamètres moyens sont respectivement de 1,6 cm et 1,9 cm. Nous constatons donc que les filtrats et les extraits des milieux de culture de la souche 102.07 décrite comme productrice d'αCA inhibent nettement et plus fortement la croissance de *E. coli* et de *B. subtilis* que ceux de la souche 115.33 et du milieu M non ensemencé. L'inhibition de la croissance des deux bactéries peut être due, au moins partiellement, à l'émission d'acide α-cyclopiazonique dans le milieu de culture de la souche 102.07. Mais il nous est impossible de dire que cet effet est dû à la seule présence de l'acide α-cyclopiazonique. En effet, les milieux de culture de 102.07 peuvent contenir beaucoup d'autres substances émises par le champignon et susceptibles d'avoir une action sur la croissance d'*Echerichia coli* et de *Bacillus subtilis*. L'ensemble de ces observations, nous a conduit à rechercher une technique nous permettant de caractériser directement la présence ou l'absence de la toxine pendant un temps de culture court.

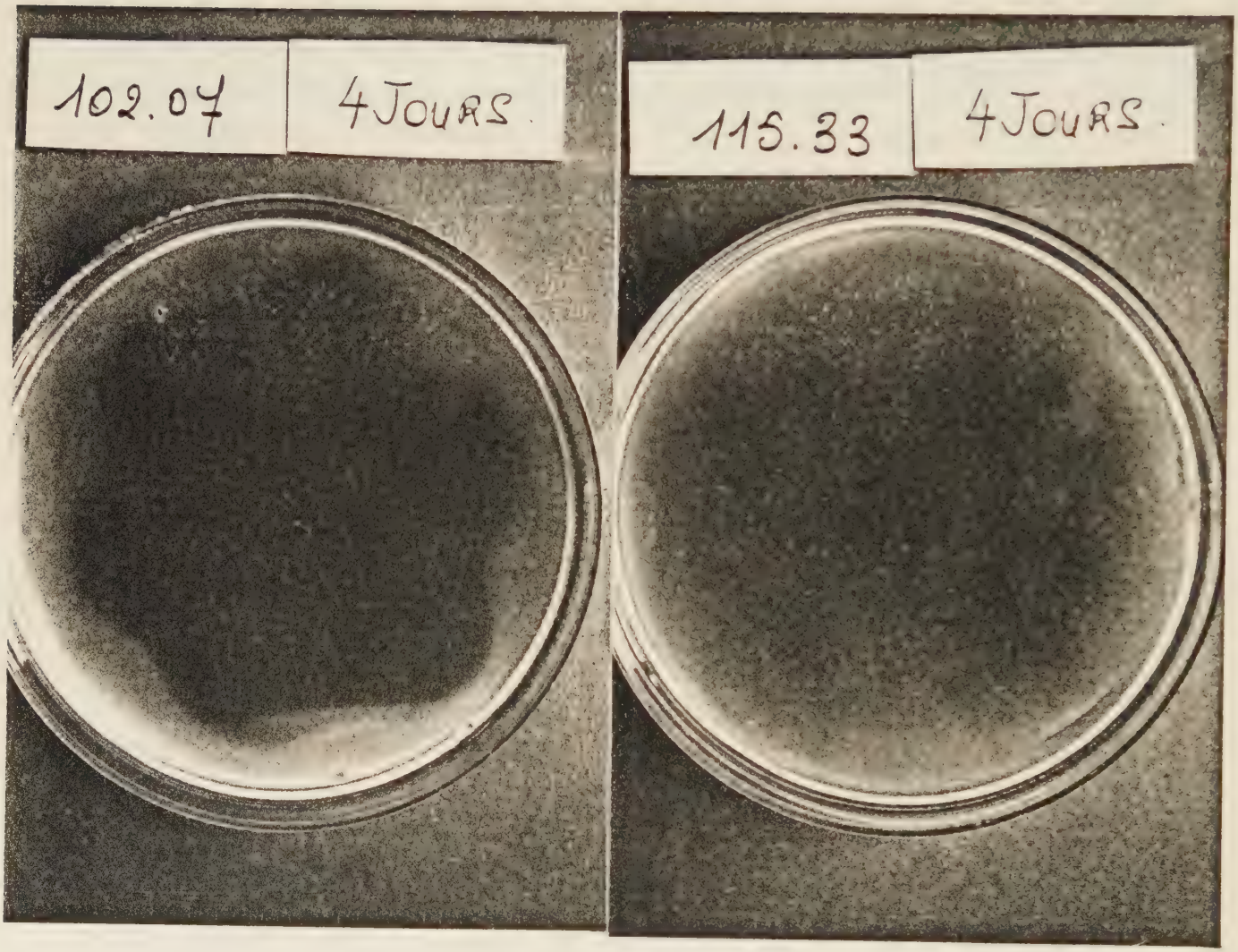
2.2.3 - Caractérisation directe de la présence d'acide α-cyclopiazonique

Une technique couramment utilisée au laboratoire pour transporter des cultures d'un milieu nutritif gélosé à un autre est l'utilisation de la cellophane (membrane semi-perméable) que l'on interpose entre le milieu et la culture. Le thalle peut donc se développer normalement à la surface de la cellophane en puisant ce qui lui est nécessaire dans le milieu et en y excrétant ses toxines, tout ceci à travers la cellophane. Il est alors possible d'oter le thalle qui a poussé dessus aux temps désirés. Si l'on suppose que la toxine a été émise dans le milieu de culture, il sera facile de caractériser sa présence en recouvrant ce milieu d'un voile bactérien et en notant l'effet produit sur la croissance de la bactérie.

Caractérisation directe de la présence d'αCA dans le milieu de culture M par son activité bactéricide (*E. coli*)

Photo n° 4 - Souche productrice

Photo n° 5 - Souche non productrice



Les observations faites à la suite de six répétitions de cet essai sont les suivantes :

- L'ensemble des thalles de 4 jours à 23°C issus de monoconidies de la souche 102.07 repiqués sur milieux A et M ont donné des halos d'inhibition de la croissance d' *E. coli* et de *B. subtilis* qui sont nets et qui ont exactement le diamètre des thalles otés avec la cellophane (photo n° 4).

- Par contre, la souche 115.33 n'a permis l'expression que de faibles halos dans quelques cas, halos toujours de diamètre plus petit que les thalles ayant poussé à cet emplacement. Dans la plupart des cas, la croissance de *E. coli* n'est pas affectée, il en est de même pour celle de *B. subtilis* (photo n° 5).

- Un certain nombre de mutants affectés dans leur aptitude à produire l'αCA ont été testés par cette technique. Dans la majorité des cas, nous pouvons établir une bonne corrélation entre la présence de halo d'inhibition de la croissance bactérienne et la présence de la toxine dans les extraits chimiques bruts. A l'inverse, une souche n'induisant aucun halo ou un halo très flou et faible, est caractérisée chimiquement comme non productrice d'αCA.

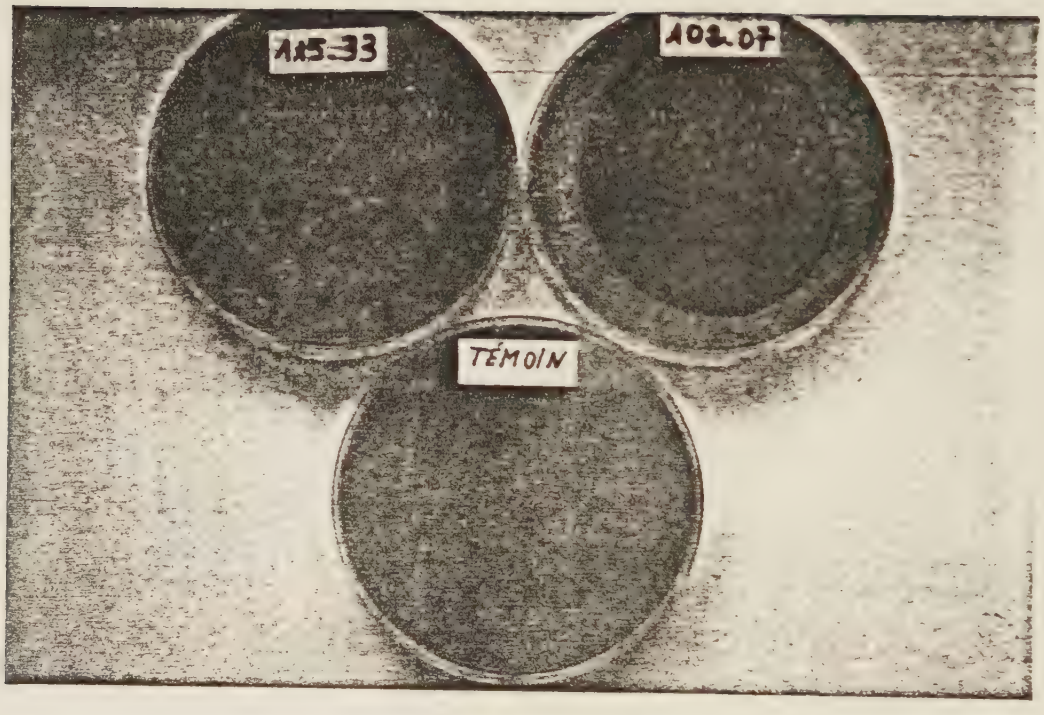
L'utilisation de cette technique a confirmé les résultats observés avec les filtrats de culture et les extraits chimiques des souches 115.33 et 102.07, à savoir un effet antibactérien de la souche 102.07 se manifestant par une inhibition de la croissance de *E. coli* et de *B. subtilis*. Elle nous a permis de plus de distinguer rapidement des mutants non producteurs d'αCA dans une population mutagénisée provenant d'une souche productrice et inversement.

De plus, cette technique demande peu de temps et peu de manipulation ce qui évite l'éventuelle dégradation des substances secrétées par les thalles et plus particulièrement de l'acide α-cyclopiazonique que nous cherchons à mettre en évidence.

2.2.4 - Conclusion

Il semble que nous observions un lien direct entre une inhibition de la croissance des deux bactéries (*E. coli* et *B. subtilis*) et la présence effective d'αCA dans le milieu de culture, et au contraire entre une croissance bactérienne normale et l'absence de toxine. Nous maintiendrons pourtant cette restriction, à savoir que l'effet antibactérien peut être dû à des métabolites excrétés par *A. oryzae* autres que l'αCA.

Photo n° 6 - Alcalinisation du milieu M par la production d'αCA : mise en évidence par l'utilisation du rouge de phénol



Nous avons alors cherché à mettre en évidence d'autres caractéristiques susceptibles d'être directement liées à la production de cette toxine.

Il a souvent été noté que l'émission de certains métabolites dans le milieu de culture provoquait des modifications du pH de ce milieu. Ceci nous a incité à contrôler, si, dans le cas qui nous intéresse, une variation de pH au cours du temps serait ou non liée à la production ou à la non production de l'αCA.

2.3 - EFFET DE LA PRODUCTION D'αCA SUR LE pH DU MILIEU DE CULTURE

Au cours de nos extractions nous avons constaté qu'après 21 jours de culture de la souche 102.07 sur milieu M liquide le pH passait d'une valeur initiale de 5,5 à une valeur de 8,45 environ. Par contre, nous n'avons noté que de faibles variations (5,5 à 6,5) après 21 jours d'incubation de la souche 115.33.

Nous avons alors mesuré précisément ces variations au cours du temps à l'aide d'un pHmètre. Les résultats obtenus sont les suivants:

TABLEAU N° 7 - Variations du pH du milieu M au cours du temps

Temps de culture / Souches	3 jours	5 jours	10 jours	15 jours	21 jours
102.07	6	6,2	7,2	7,82	8,45
115.33	5,7	6,23	5,51	5,95	6,5

N.B. : Ces valeurs correspondent à la moyenne de quatre répétitions.

Une telle différence entre le comportement de nos deux souches nous a incité à rechercher une substance colorée indicatrice de pH, changeant nettement de couleur à un pH compris entre 6,5 et 7,0 et n'ayant aucun effet néfaste sur le développement d'*A. oryzae* et la production d'αCA. Le rouge de phénol semble répondre à cette demande. Il vire du jaune au rouge vif entre pH 6,8 et 7,0.

Les souches 102.07 et 115.33 cultivées 10 jours sur milieu M en présence du rouge de phénol ont donné respectivement une coloration rouge et une coloration jaune du milieu de culture (photo n° 6).

La visualisation de cette différence de couleur liée à la variation du pH du milieu M en présence de chacune des deux souches nous a servi comme nouveau critère afin de distinguer une souche productrice d'acide α-cyclopiazonique, d'une souche non productrice. Cependant, il n'est pas possible d'attribuer cette variation de pH à la seule production d'acide α-cyclopiazonique.

2.4 - CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenus par chromatographie sur gel de silice en couches minces, et par les techniques de spectrométrie ultra-violette et RMN ^{1}H prouvent d'une manière évidente que la souche 102.07 produit effectivement l'acide α-cyclopiazonique et que la souche 115.33 ne le produit pas. Par conséquent, ces résultats confirment ceux obtenus en 1977 par ORTH (52).

D'autre part, les observations réalisées à la suite des tests antibactériens pour nos deux souches vis-à-vis d'*E. coli* et de *B. subtilis*, ainsi que celles concernant les variations de pH du milieu de culture M, montrent que la souche 102.07 productrice d'αCA, manifeste des propriétés biologiques différentes de celle de la souche 115.33.

Par ailleurs, les extraits purs de l'acide α-cyclopiazonique en notre possession ont produit les mêmes symptômes d'inhibition de la croissance des deux bactéries, que la souche 102.07.

Il semble donc que nous ayons mis en évidence une corrélation étroite entre la production d'αCA et certaines propriétés biologiques telles que l'inhibition de la croissance bactérienne et l'alcalinisation du milieu de culture. Cette corrélation nous a servi de base et d'argument afin d'utiliser ces propriétés biologiques différentes entre souches productrices d'αCA ou non, comme un crible sélectif.

Cependant, il s'avère que la sensibilité de ce crible ne soit pas parfaite puisque plusieurs jours sont nécessaires pour une production suffisante d'αCA conduisant à une inhibition de la croissance bactérienne ou permettant l'expression d'une variation nette de pH. Ceci nous a contraints à n'utiliser ce crible qu'après isolement un à un d'un grand nombre de clones à partir d'une population mutagénisée ou non.

Malgré tout, le gain de temps est considérable, si l'on considère qu'auparavant, nous ne pouvions sélectionner des individus modifiés quant à leur aptitude à produire l'αCA, qu'après extraction chimique et caractérisation par chromatographie ou spectrométrie.

Ce crible a été mis à profit pour la suite de notre travail. En effet, afin d'avoir une idée sur le nombre de gènes codant pour la production de l'αCA, nous avons cherché à réaliser un test de complémentation entre des souches d'*A. oryzae* de même origine ou d'origines différentes, qu'elles soient productrices ou non productrices d'αCA.

Pour cela nous avons recherché des mutants non producteurs d'αCA à partir de la souche productrice 102.07, et des mutants producteurs d'αCA à partir de la souche non productrice 115.33. De tels mutants ont été isolés grâce au crible décrit précédemment.

CHAPITRE III : RECHERCHE DE MUTANTS MODIFIES DANS LEUR APTITUDE A PRODUIRE LA TOXINE

3.1. CHOIX DE L'AGENT MUTAGENE

3.1.1. Courbes de survie

Les courbes de survie des conidies issues de thalles jeunes et âgés des deux souches 102.07 et 115.33 (fig. 6, 7, 8, 9), réalisées après traitement par la nitrosoguanidine ou aux rayons ultra-violets présentent un palier.

Ce palier plus ou moins décalé suivant l'âge des thalles et suivant l'agent mutagène utilisé, demeure constant malgré l'augmentation des doses de mutagène avant de chuter pour des doses fortes.

Nous notons une plus grande sensibilité des conidies issues de thalles jeunes aux deux mutagènes utilisés. Ceci se caractérise par un pourcentage de survivants toujours inférieur chez les conidies issues de thalles jeunes et ceci quelle que soit la dose de mutagène utilisée, comme le montrent les tableaux n° 8 et 9 ci-dessous.

TABLEAU N° 8 - Pourcentage de survivants après traitement par la NTG

Souches / Dose de NTG en µg/ml	102.07		115.33	
	Conidies issues de thalles de 5 jours	Conidies issues de thalles de 12 jours	Conidies issues de thalles de 3 jours	Conidies issues de thalles de 10 jours
50	16%	24%	17%	30%
100	12%	18%	10%	17%
200	4%	7%	8%	14%

TABLEAU N° 9 - Pourcentage de survivants après traitement par les rayons UV

Souches / Dose d ' $U.V_2$ ergs/mm^2	102.07		115.33	
	Conidies issues de thalles de 5 jours	Conidies issues de thalles de 12 jours	Conidies issues de thalles de 3 jours	Conidies issues de thalles de 10 jours
600	25%	74%	33%	39%
1000	2%	74%	26%	31%
2000	1%	66%	9%	13%

Figure 6

COURBE DE SURVIE DE LA SOUCHE 102_07
A LA NITROSOGUANIDINE

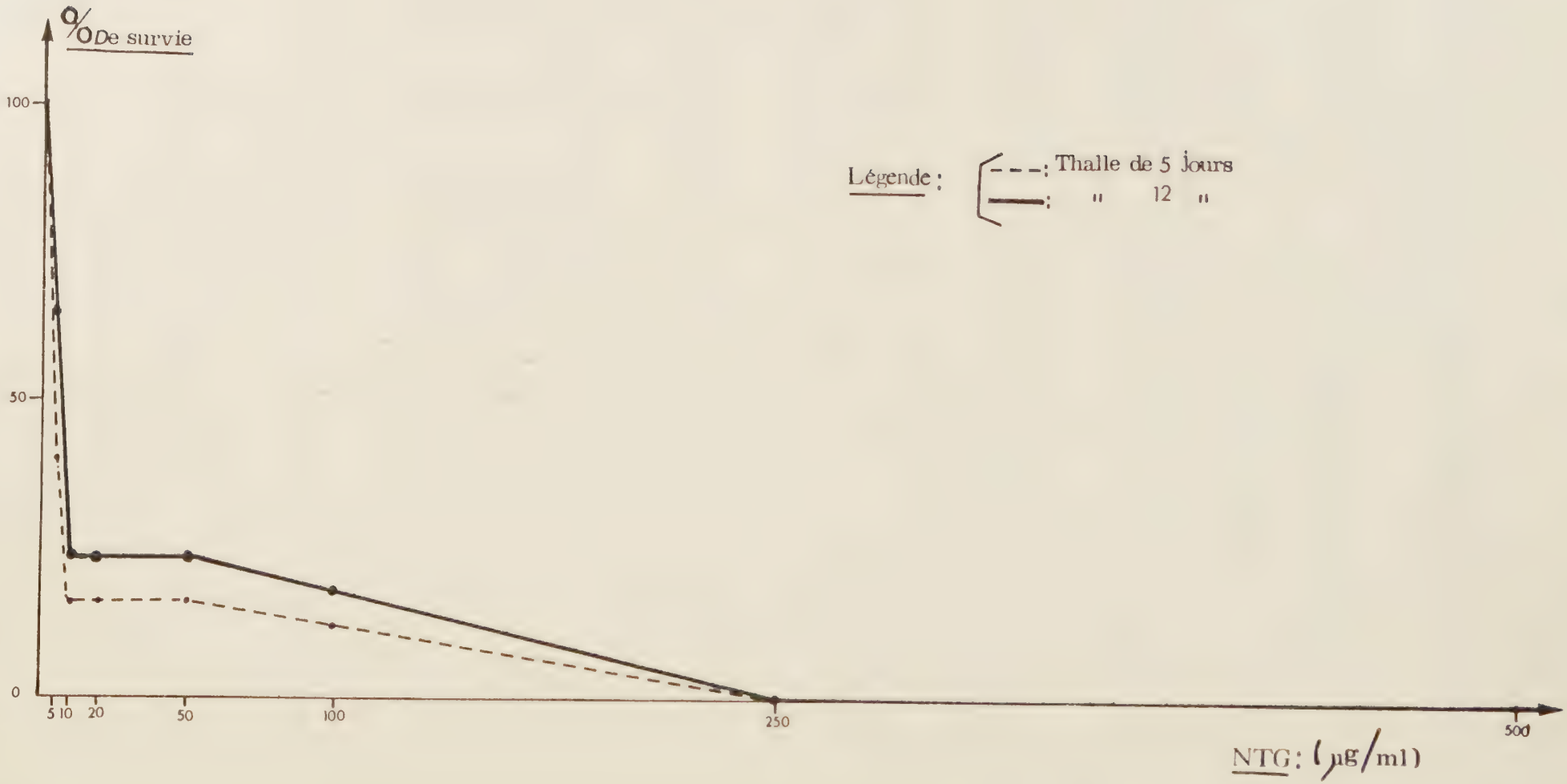


Figure 7

COURBE DE SURVIE DE LA SOUCHE 102_07 AUX RAYONS ULTRA_VIOLETS

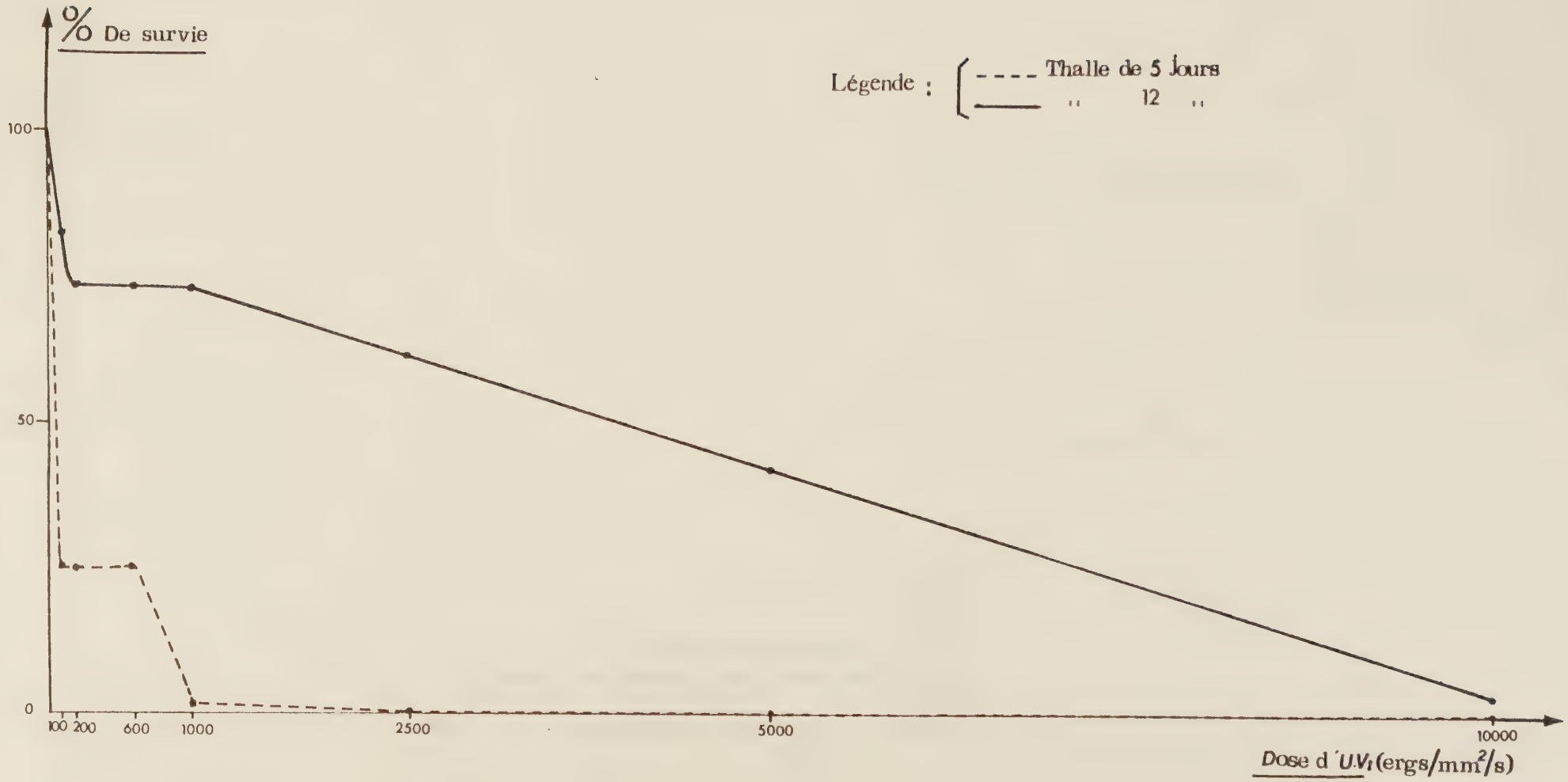


Figure 8

COURBE DE SURVIE DE LA SOUCHE 115-33 A LA NITROSOGUANIDINE

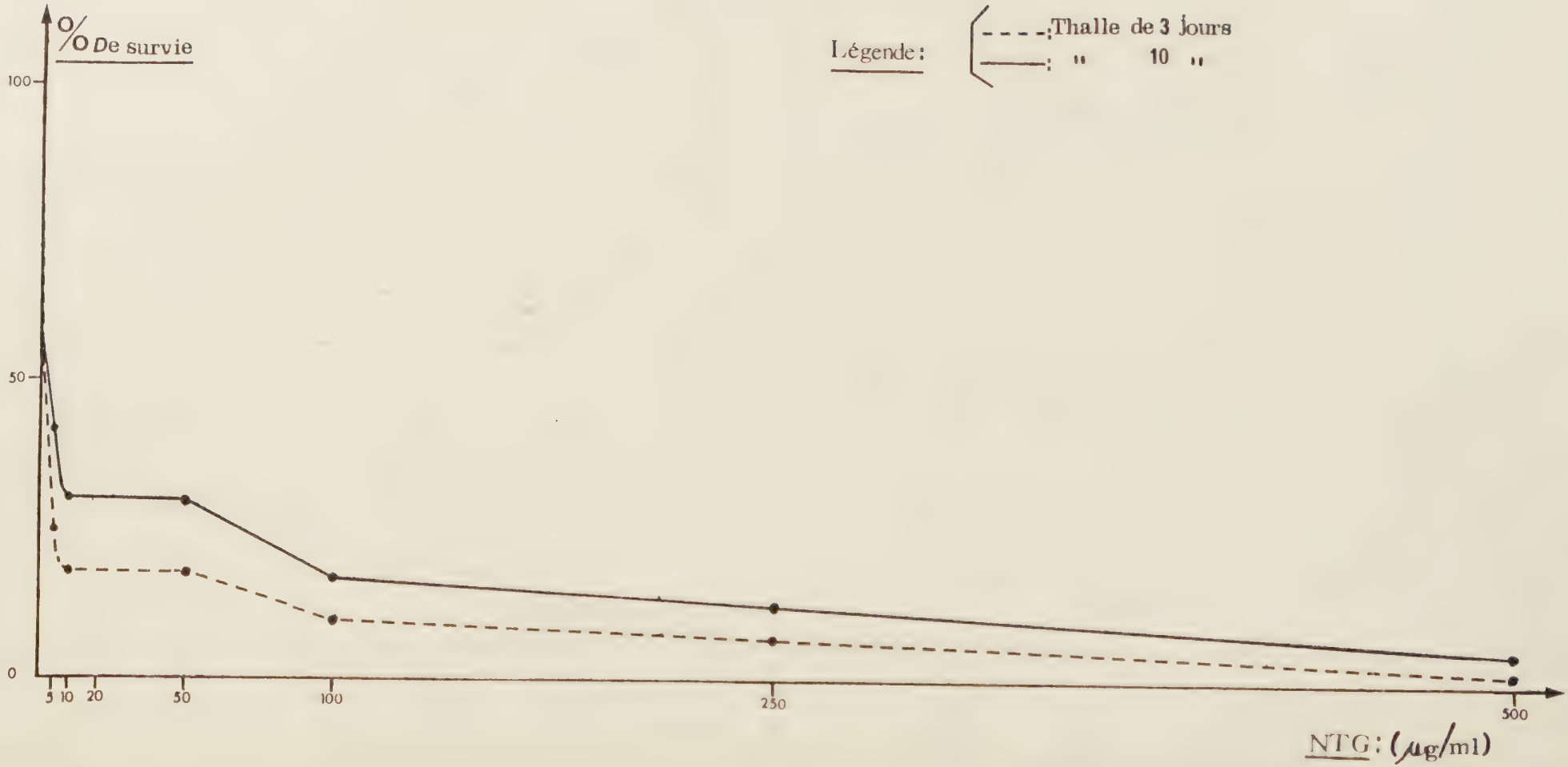


Figure 9

COURBE DE SURVIE DE LA SOUCHE 115-33 AUX RAYONS ULTRA-VIOLETS

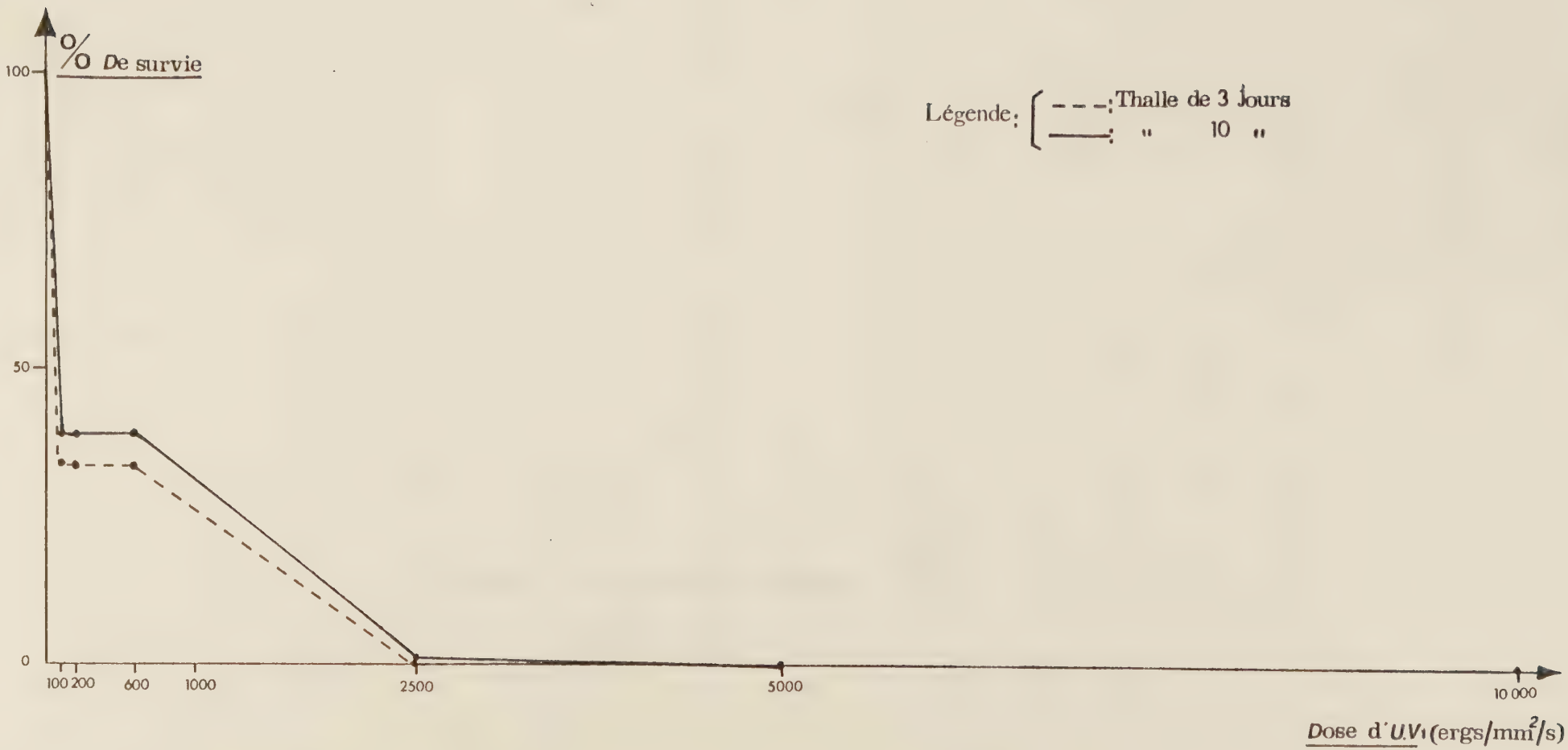
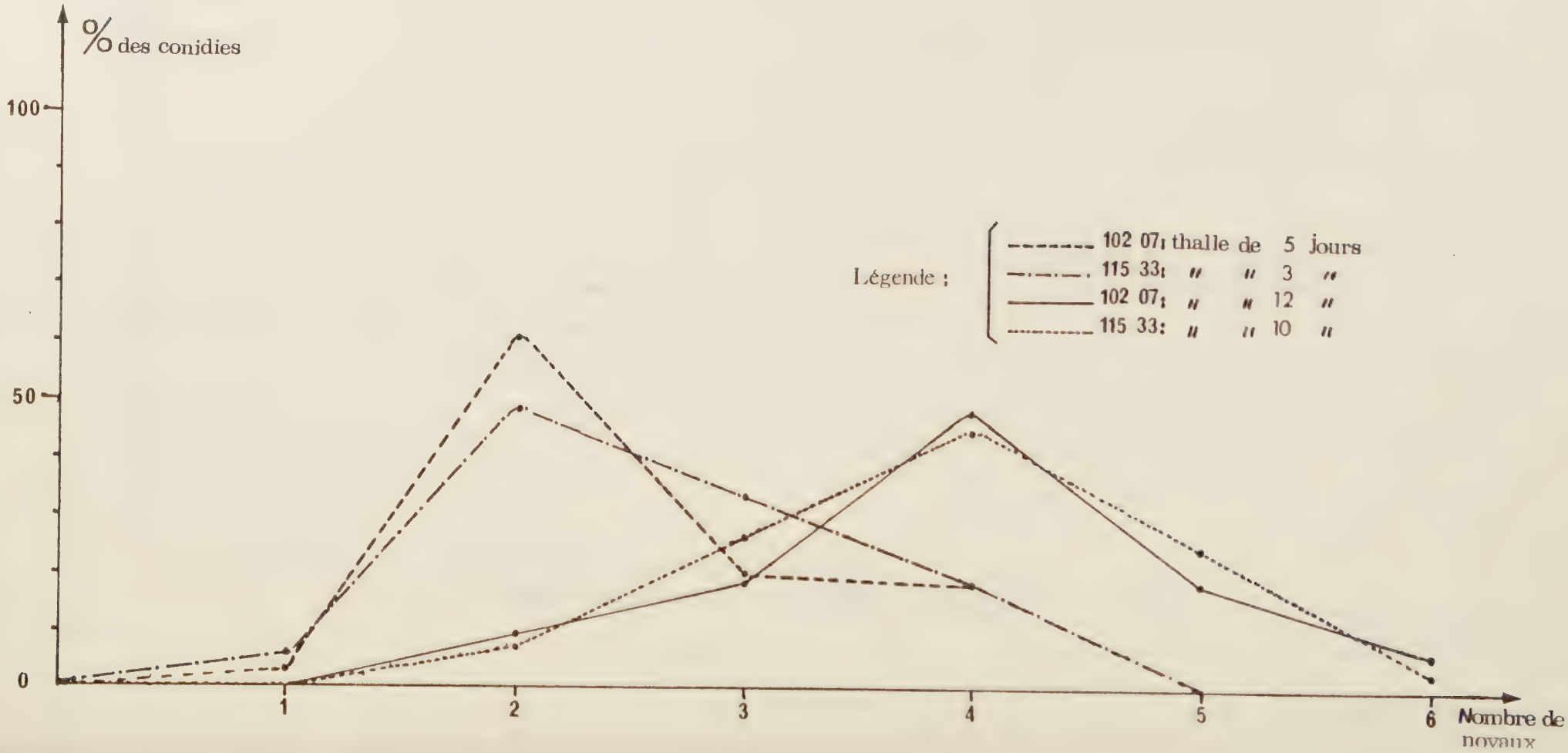


Figure 10

NOMBRE DE NOYAUX PAR CONIDIE



Nous savons que chez *A. oryzae* le nombre de noyaux par conidies est très variable suivant l'âge des thalles et suivant les souches. Nous avons donc entrepris une étude plus fine de ce problème.

3.1.2. Nombre de noyaux par conidie en fonction de l'âge des thalles

Nous avons coloré les noyaux de conidies provenant de thalles jeunes (3 jours pour la souche 115.33 et 5 jours pour la souche 102.07) et provenant de thalles plus âgés (10 jours pour la souche 115.33 et 12 jours pour la souche 102.07). La technique utilisée est celle décrite dans la première partie, colorant les noyaux par le Giemsa. Des comptages de noyaux sont effectués pour chaque souche et chaque âge. La figure n° 10 donne la répartition des noyaux dans chaque population conidienne.

Nous remarquons que les conidies issues de thalles jeunes des souches 102.07 et 115.33 contiennent en moyenne 2 noyaux alors que nous en avons dénombré en moyenne 4 chez les conidies issues des thalles âgés .

3.1.3. Discussion

Nous pouvons dès à présent dégager une relation entre le nombre de noyaux par conidie et leur sensibilité aux deux mutagènes utilisés.

L'obtention de courbes de survie présentant un palier ne peut donc être expliquée que par l'existence de plusieurs noyaux par conidie. En effet, chez d'autres organismes possédant des conidies uninucléées les courbes de survie ne présentent jamais ce palier (ex : *Penicillium caseicolum*).

La grande sensibilité des conidies issues de thalles jeunes aux agents mutagènes peut aussi être expliquée par la structure de la paroi externe. En effet, des études en microscopie électronique (60) ont montré que les parois des conidies de certaines souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* s'épaississent avec l'âge. On peut donc envisager que chez les conidies issues de thalles jeunes la nitrosoguanidine pénètre plus facilement. D'autres études (65) ont montré que la résistance et la viabilité des conidies ne sont pas uniquement influencées par la différence entre les souches, mais aussi par l'âge des conidies. En effet, les spores matures étant plus fortement pigmentées que les spores jeunes, elles résistent mieux aux mutagènes physiques (UV). Certains auteurs (72) ont montré que, dans la nature, les conidies hyalines sont plus sensibles aux rayons ultra-violets que les conidies fortement colorées.

Nous remarquons de plus que les deux souches sont plus affectées par la nitrosoguanidine que par les rayons ultra-violets.

Sur un simple critère phénotypique, nous observons, en effet, un plus grand nombre de mutants morphologiques différents de la souche initiale et présentant une grande diversité entre eux après traitement à la NTG.

En conclusion, nous pouvons dire qu'il existe une relation entre l'âge des thalles, le nombre de noyaux contenu par les conidies, et leur taux de survie après un traitement mutagène.

En se basant sur l'ensemble de ces constatations, nous avons choisi, pour la suite de ce travail, la nitrosoguanidine comme agent mutagène. Nous l'utiliserons à une dose de 100 γ correspondant à 10% de survivants parmi les conidies issues des jeunes thalles.

3.2 - RECHERCHE ET OBTENTION DE MUTANTS αCA MODIFIES

3.2.1 - Recherche de mutants

Nous avons recherché particulièrement, d'une part des mutants producteurs d'αCA à partir de la souche non productrice 115.33 et d'autre part des mutants non producteurs de cette toxine à partir de la souche productrice 102.07.

Après traitement mutagène, les monoconidies survivantes de chacune de nos deux souches sont prélevées, clonées une à une sur le milieu PDA gélosé puis testées quant à leurs effets sur la croissance de *E. coli* et de *B. subtilis* (technique de la cellophane) d'une part, et d'autre part sur milieu M contenant du rouge de phénol.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux mutants obtenus à partir de la souche productrice 102.07 qui n'ont pas inhibé la croissance des deux bactéries et n'ont révélé aucune variation de pH dans le milieu M. Ces mutants sont supposés non producteurs de la toxine.

Par contre, en partant de la souche 115.33 non productrice, nous avons recherché les individus inhibant la croissance des bactéries "test" et induisant une variation de pH du milieu M. Ces mutants sont présumés producteurs d'αCA.

Pour tous les individus retenus, une analyse chimique est effectuée (extraction, chromatographie, spectrométrie U.V. et RMN ^{1}H) afin de confirmer les résultats notés par les tests. A la suite de cette analyse, certains clones mutants furent éliminés. Nous n'avons retenu que ceux donnant une réponse par tout ou rien. Ces mutants sont les suivants :

- à partir de la souche 102.07, nous avons conservé deux clones non producteurs obtenus avec une fréquence de 3.10^{-4} et appelés TB 500 et 32.1 ;

- à partir de la souche 115.33, nous avons conservé deux clones producteurs obtenus avec une fréquence de 4.10^{-4} et appelés NPP7 et 450.

3.2.2 - Caractéristiques biologiques de ces mutants

Ces mutants vont nous servir pour la suite de notre travail. Il nous faut avoir une connaissance précise de leur comportement dans les conditions de culture habituelles.

Après neuf jours de culture à 23°C sur le milieu PDA gélosé, nous avons comparé les caractéristiques de ces mutants à celles de leurs souches d'origine. Ces caractéristiques sont résumées dans le tableau n° 10 suivant.

TABLEAU N° 10 - Caractéristiques biologiques des mutants obtenus

	Souches	Production d' αCA	Phénotypes	Croissance (Ø en mm)	Sporulation (conidies/ thalle)
Souche-mère	102.07	+	Mycélium abondant, vert	65	36.10^{6}
Mutants	TB 500	-	Myc.peu abondant, vert	65	7.10^{6}
	32.1	-	Myc.peu abondant, vert	51	$4,5.10^{6}$
Souche-mère	115.33	-	Myc. rare, vert foncé	57	144.10^{6}
Mutants	NPP7	+	Myc.peu abondant, blanc	69	$0,01.10^{6}$
	450	+	Myc. rare, blanc	48	$0,01.10^{6}$

- : ne produit pas l'αCA

+ : produit l'αCA

3.2.3. Obtention d'un mutant hyperproducteur d'αCA

L'utilisation du crible mettant en jeu l'inhibition de la croissance bactérienne en présence de toxine, nous a permis d'isoler au cours d'une mutagenèse un individu issu de 102.07 donnant un halo plus grand et plus net que celui produit pas la souche non mutante.

Ce mutant appelé T 50 a subi une analyse chimique quantitative en RMN ^{1}H. Celle-ci a permis de déceler 3,89 mg d'αCA dans 47,5 mg d'extrait brut de ce mutant, soit 8,2% d'αCA alors que la souche 102.07 n'avait donné que 5,7% de la même toxine. Le mutant T 50 produit un peu plus d'αCA que sa souche-mère. Il est donc possible d'obtenir des mutants hyperproducteurs de cette toxine. Signalons toutefois, que ce mutant possède les mêmes caractéristiques biologiques que la souche-mère 102.07 dont il est issu.

3.3. CONCLUSION

L'obtention de mutants modifiés dans leur taux de production d'αCA n'a été possible que grâce aux cribles que nous avons élaborés dans la première partie de ce travail. Les difficultés d'obtention de tels mutants suggèrent que la production d'αCA soit commandée par un petit nombre de gènes seulement. La suite de cette thèse devrait apporter des informations sur ce point.

La souche 115.33 non productrice d'αCA ainsi que les mutants TB500 et 32.1 incapables de produire l'αCA obtenus à partir de la souche 102.07 présentent des caractéristiques biologiques différentes. Ces trois souches n'ayant pas la même origine, il est possible d'imaginer qu'elles sont bloquées à des niveaux différents de la chaîne de biosynthèse de l'αCA. Une analyse biochimique des précurseurs accumulés par chacune d'elles, permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Par ailleurs, si cette hypothèse est vraie, des confrontations entre ces souches pourraient engendrer des descendants producteurs d'αCA. Dans le cas contraire, la non obtention de descendants producteurs de cette toxine signifierait probablement que ces souches sont bloquées à une même étape de la chaîne de biosynthèse de l'αCA. En absence de reproduction sexuée chez *A. oryzae*, nous avons envisagé de réaliser une ou plusieurs étapes du cycle parasexuel qui permettrait, d'une part un brassage et un remaniement du matériel génétique, d'autre part d'acquérir quelques connaissances sur le système génétique contrôlant la production de l'αCA.

TROISIEME PARTIE : HETEROCARYOSE ET RECOMBINAISON MITOTIQUE

INTRODUCTION

Afin d'apporter quelques connaissances sur le système génétique contrôlant la chaîne de biosynthèse de l'acide α-cyclopiazonique, nous avons envisagé de confronter des souches de même origine génétique ou d'origines différentes qu'elles soient productrices ou non productrices de la toxine.

Chez les eucaryotes c'est la méiose qui assure, d'une part le brassage des chromosomes en les répartissant aléatoirement dans les cellules filles et, d'autre part, leur remaniement par des "crossing-over". Elle permet ainsi l'obtention de nouveaux génotypes. Mais de nombreux champignons n'ont pas de cycle sexué comme c'est en particulier le cas d'*A. oryzae*. Chez eux, l'obtention de nouvelles combinaisons génétiques n'est éventuellement assurée que par la voie parasexuelle. Dans le genre *Aspergillus*, l'existence d'un cycle parasexuel a été mise en évidence en 1953 (29) par KENNETH et ses collaborateurs chez *A. niger* et *A. nidulans*. En 1956, PONTECORVO (54) a mené une étude plus détaillée du cycle parasexuel chez *A. nidulans* ; il a montré que la réalisation du cycle parasexuel passait par trois étapes essentielles :

* La réunion dans un même cytoplasme de noyaux génétiquement différents formant un hétérocaryon.

* La fusion de ces noyaux conduisant à la diploïdie.

* Le retour à l'état de ploïdie initial par haploïdisation donnant naissance à des individus recombinés.

L'existence d'un cycle parasexuel chez *A. oryzae* a été montrée par ISHITANI et coll. en 1956 (26, 27), par THORBEK et ELPOV en 1974 (71) et enfin par MALARD (44) en 1981. Les travaux de LHOAS ont montré l'existence de ce cycle chez *A. niger* en 1961 (40), ceux de BENNET et coll. en 1980 le mettaient en évidence chez *A. parasiticus* (3). Dernièrement, signalons qu'un travail détaillé a été réalisé en 1982 par LEACH et YODER (36) sur un autre champignon : *Cochliobolus heterostrophus (Helminthosporium maydis)* sur ce même problème.

CHAPITRE I : OBTENTION DE LIGNEES GENETIQUEMENT MARQUEES

L'analyse des produits des confrontations nécessite l'utilisation de souches génétiquement marquées. Ce marquage permet l'identification des individus hétérocaryotiques diploïdes, recombinés et parentaux. Plus ce marquage est dense, plus les informations sont précises. Pourtant, des mutagenèses successives aboutissant à une multiplicité de mutations sur un même génome présentent souvent l'inconvénient d'altérer l'expression physiologique normale de ce génome.

Pour la suite de notre travail, nous avons cherché à marquer nos souches par des auxotrophies différentes et par des résistances à des inhibiteurs. Signalons que dans certains cas, nous nous sommes servis de la différence morphologique entre certaines de nos souches comme d'un marqueur.

I.1 - MARQUAGE PAR UNE AUXOTROPHIE

La recherche de mutants auxotrophes à partir des souches sauvages I 02.07 et I15.33 et des deux souches mutants TB500 et 32.1 ne produisant plus d'αCA, a été réalisée grâce au protocole décrit dans le chapitre III de la Première Partie.

I.1.1 - Obtention de mutants auxotrophes

Plusieurs mutagenèses indépendantes ont permis de sélectionner différents types d'auxotrophies avec des fréquences variables. Le tableau n° 11 regroupe l'ensemble de ces résultats.

Les résultats obtenus montrent que les auxotrophies proline$^-$, asparagine$^-$ et tryptophane$^-$ sont les plus fréquentes parmi les mutants obtenus. L'obtention de quelques types de mutants auxotrophes majoritaires est un phénomène que l'on rencontre chez d'autres organismes ; il semble être lié à la souche et à l'agent mutagène utilisé. Effectivement, la mutation proline dépendante n'est obtenue qu'à partir de la souche I02.07. Parmi les quatre mutants asparagine$^-$, trois proviennent de la souche 32.1. Nous pouvons dire aussi que les cinq auxotrophies tryptophane$^-$ sont issues de la même souche, car les souches TB500 et 32.1 ont la même origine (I 02.07).

TABLEAU N° 11 - Auxotrophies obtenues à partir des quatre souches 102.07, 115.33 TB500 et 32.1

Auxotrophies obtenues	Souches				Total
	102.07	115.33	TB500	32.1	
Asparagine		1		3	4 *
Acide glutamique/ Adermine			1		1
Histidine/vitamine B1	1				1
Méthionine	1	1			2
Acide para-aminoben-zoïque (P.A.B.)			1		1
Proline	5				5 *
Tryptophane	2		1	2	5 *
Acide folique	1				1
Non déterminée	2	1		1	4
Total	12	3	3	6	24
Nombre de clones testés	3.10^3	3.10^3	3.10^3	3.10^3	12.10^3
Fréquence d'obtention d'un auxotrophe	4.10^{-3}	1.10^{-3}	1.10^{-3}	2.10^{-3}	2.10^{-3}

Légende :

* : auxotrophie plus fréquente

Une remarque est à faire quant à l'apparition de doubles mutations auxotrophes. Parmi les 24 mutants auxotrophes isolés, nous en avons caractérisé deux requiérant à la fois un acide aminé et une vitamine pour leur croissance. Cette proportion est relativement élevée. A notre connaissance chez *A. oryzae*, aucun auteur n'a noté l'apparition après mutagenèse d'individus présentant une double auxotrophie. Nous avons été contraints d'éliminer certains mutants présentant une croissance médiocre sur PDA, une faible conidiogenèse ou une croissance résiduelle sur le milieu minimum. Parmi les mutants de la souche 115.33, seul le mutant 41.5 d'auxotrophie non déterminée ne manifeste pas l'un ou l'autre de ces incovénients, nous l'avons donc retenu pour la suite de ce travail.

1.1.2 - Caractéristiques biologiques des auxotrophes retenus

Après neuf jours de culture sur le milieu PDA, nous avons déterminé les caractéristiques biologiques de chacun des mutants auxotrophes retenus. Elles sont résumées dans le tableau n° 12.

Au cours des repiquages successifs de ces auxotrophes sur milieu PDA, nous n'avons jamais noté de reversion spontanée conduisant de nouveau à la prototrophie. Ces mutants se sont montrés stables tout au long de notre travail.

Ces mutants auxotrophes ne poussant pas sur le milieu M, leur aptitude à produire ou non la toxine a été testée sur le milieu M supplémenté avec le facteur de croissance requis ou sur le milieu A.

1.2 - MARQUAGE PAR UNE RESISTANCE AU BENOMYL

La sélection de mutants résistants à un inhibiteur est simple, elle bénéficie d'un crible positif. En effet, il suffit d'isoler les clones qui croissent en présence de doses d'inhibiteur non permissives pour les souches sauvages. Après avoir testé l'effet du bénomyl et du tridémorphe sur les conidies de nos souches sauvages, seul le bénomyl s'est avéré être efficace. Utilisé à des doses de 5 ppm et 1 ppm, il a un effet fongicide respectivement sur les conidies de la souche 102.07 et de la souche 115.33. Dans le but de réaliser un double marquage, nous avons recherché des résistants au bénomyl soit à partir des souches d'origine, soit à partir de divers mutants auxotrophes. L'échec dans plusieurs tentatives dans le but d'obtenir des mutants résistants à un inhibiteur, nous a contraints à suivre les évènements du cycle parasexuel en ne faisant intervenir que des mutants simple ou double auxotrophes. Dans certains cas, des différences morphologiques nous ont servi de marqueurs.

TABLEAU N° 12 - Caractéristiques biologiques des mutants auxotrophes retenus, après neuf jours de culture

Souches d'origine		Auxotrophes obtenus	Auxotrophies	Croissance (diamètre en mm)						Sporulation sur PDA (conidies/thalles	Pourcentage de germination sur PDA	Phénotypes sur PDA	production de la toxine
				PDA	MM	MM+F	M	M+F	A				
102.07		AMY1	Méthionine	65	11	59	11	60	48	$50\ 10^5$	95%	Mycélium aérien abondant vert	+
		AP3	Proline	44	0	40	0	25	35	$0,4\ 10^5$	10%	Mycélium rare, vert	+
		AP4	Proline	43	0	40	0	25	38	$0,2\ 10^5$	15%	Mycélium aérien abondant vert	+
		ATY2	Tryptophane	60	6	42	6	45	52	$0,1\ 10^5$	30%	Mycélium aérien abondant beige	+
		AY1	Histidine et vitamine B1	59	0	54	0	36	37	$35\ 10^5$	98%	Mycélium aérien rare, vert	+
		P.2.6	Acide folique	35	0	44	0	45	53	$70\ 10^5$	98%	Mycélium aérien abondant vert	+
115.33		34.8	Asparagine	64	0	50	0	76	70	$127\ 10^5$	53%	Mycélium aérien rare, beige	-
		41.5	Inconnue	58	0	-	0	-	90	$197\ 10^5$	98%	Mycélium aérien rare vert foncé	-
102.07	32.1	4.6	Asparagine	44	0	36	0	51	50	$16\ 10^5$	62%	Myc.peu abond. vert très clair	-
		405	Tryptophane	48	10	37	9	49	54	$10\ 10^5$	96%	" " " blanc-beige	-
		82.5	Asparagine	42	0	41	0	51	48	$35\ 10^5$	70%	Mycélium rare, vert très clar	-
	TB500	22.2	Acideglutamique et Adermine	63	5	50	4	49	64	$80\ 10^5$	98%	Myc.aérien abondant blanc-beige	-
		54.6	Acide paraaminobenzoïque (P.A.B.)	62	10	42	9	50	65	$130\ 10^5$	98%	" " " vert blanc	-

Légende : MM : milieu minimum

MM+F : milieu minimum supplémenté avec le facteur de croissance requis

\+ : produit la toxine

\- : ne produit pas la toxine

Il faut noter toutefois, que bien qu'ayant tenu compte du pourcentage de germination des auxotrophes, nous n'avons testé qu'une seule dose de NTG (100 µg/ml) correspondant à un taux de survie de 10% pour des conidies issues de thalles sauvages jeunes. De plus, nous n'avons utilisé qu'une seule dose de bénomyl, double de celle inhibitrice pour nos souches, pour cribler des mutants résistants. Nous n'étions certainement pas dans les conditions optimales pour les obtenir.

Photo n° 7 - Formation d'anastomoses végétatives chez *A. oryzae*

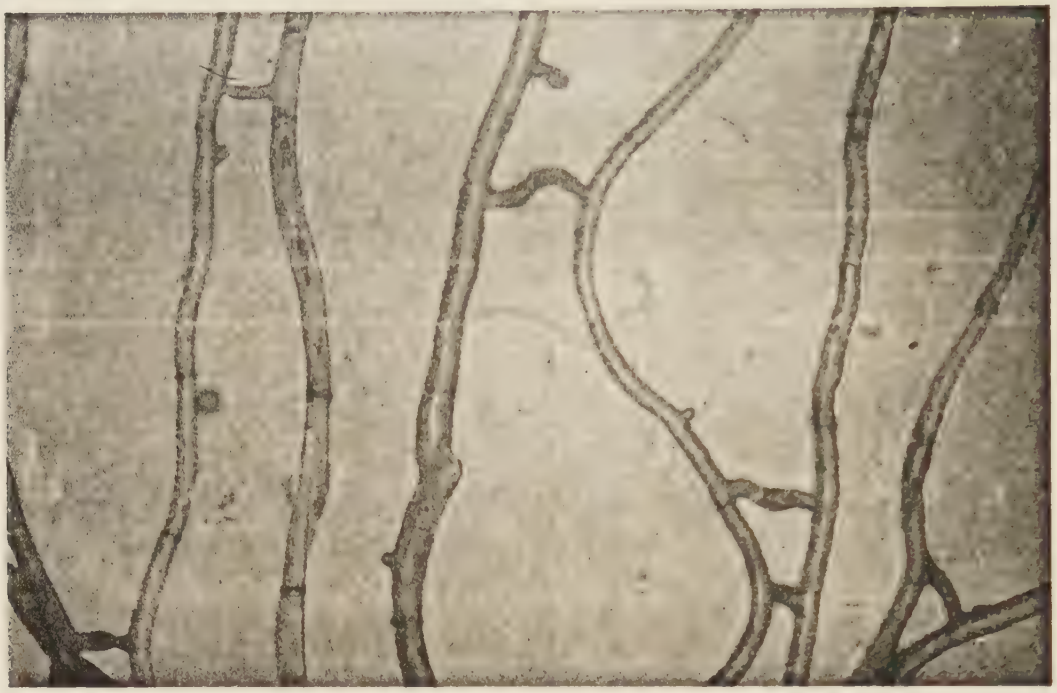


Photo n° 8 - Apparition de secteurs prototrophes après confrontation de deux mutants auxotrophes par la méthode des semis linéaires

CHAPITRE II : SYNTHESE D'HETEROCARYONS "FORCES"

2.I - PAR LA VOIE DES ANASTOMOSES VEGETATIVES

2.1.1 - Réalisation des anastomoses végétatives

La technique décrite au chapitre III de la Première Partie nous a permis de suivre la formation d'anastomoses au sein d'une même souche et entre deux souches différentes (photo n°7). L'observation d'auto-anastomoses nous a permis de vérifier que les mutants utilisés n'ont pas perdu cette aptitude. Elles se forment au niveau des parties jeunes du thalle, à l'apex ou dans la région subapicale des hyphes. Les filaments qui vont s'anastomoser émettent des ramifications qui entrent en contact. Peu après, les parois se lysent au point de contact, les protoplasmes des deux hyphes se mêlent. Lorsque l'anastomose unit deux rameaux appartenant à deux lignées génétiquement différentes, elle conduit à un hétéroplasmon au sein duquel les deux informations génétiques vont cohabiter.

Cette première étape est un préalable requis pour initier le cycle de recombinaison parasexuelle.

2.1.2 - Obtention de thalles prototrophes

Nous avons confronté, deux à deux, en condition stérile, des mutants auxotrophes de génotypes différents. Après dix jours de culture, la plupart des confrontations forment des secteurs prototrophes à croissance active sur le milieu minimum (photo n° 8). L'ensemble des résultats obtenus est décrit dans le tableau n° 13.

2.1.3 - Conclusion

Malgré plusieurs tentatives, nous constatons que certaines confrontations réalisées avec des auxotrophes issus d'une même souche sauvage, ou ayant des origines différentes, n'ont pas engendré un thalle prototrophe. Cependant, d'autres confrontations utilisant des auxotrophes n'ayant pas la même origine ont donné un thalle prototrophe. Donc, dans notre cas, l'impossibilité d'engendrer un thalle capable de croître sur le milieu minimum n'est pas due à l'origine des individus confrontés. En effet, l'obtention d'un hétérocaryon peut être contrôlée par deux facteurs essentiels :

TABLEAU N° 13 - Résultats des confrontations par la voie des anastomoses végétatives

			Producteurs d'αCA						Non producteurs d'αCA						
		Souches-mères	102.07						115.33		TB500*			32.1*	
		Auxotrophes	AMY1	AP3	AP4	ATY2	AY1	P2.6	34.8	41.5	4.6	40.5	82.5	22.2	54.6
Producteurs d'αCA	102.07	AMY1 (Met⁻)							+	+			+		
		AP3 (Pro⁻)			▨			+		+					
		AP4 (Pro⁻)						+							+
		ATY2 (Trp⁻)										▨			
		AY1 (His⁻/Bl⁻)													
		P2.6 (A.folique)									+				+
Non producteurs d'αCA	115.33	34.8 (Aspn⁻)								+	▨	+	▨	+	
		41.5 ?									+	+	+	+	+
	TB500*	4.6 (Aspn⁻)										+	▨	+	+
		40.5 (Trp⁻)											+	+	+
		82.5 (Aspn⁻)												+	+
	32.1*	22.2 (Gglu⁻ et Adermine⁻)													+
		54.6 (P.A.B.⁻)													

Légende : + : Obtention d'un thalle prototrophe ; □ : Pas d'obtention d'un thalle prototrophe ; ▨ : Non confrontés, car ils ont la même auxotrophie ; * : Les souches TB500 et 32.1 non productrices d'αCA ont été obtenues à partir de 102.07

a) L'aptitude à s'anastomoser :

L'aptitude à s'anastomoser est une propriété génétique, altérable par mutation. Or, nous avons montré que tous nos mutants ont conservé l'aptitude à s'anastomoser. Par conséquent, dans notre cas, l'empêchement à engendre un thalle prototrophe ne peut pas être dû à ce facteur.

b) Incompatibilité cellulaire :

Elle représente le plus grand obstacle à la formation d'un hétérocaryon, donc à l'initiation du cycle parasexuel. Malgré la formation d'anastomoses, la fusion de deux hyphes n'engendre pas un thalle viable. On peut penser que cette incompatibilité cellulaire est induite par les mutagenèses. L'incompatibilité cellulaire entre les individus confrontés nous a semblé être l'unique cause de la non obtention de thalles prototrophes. Ceci nous a incité à tenter de réaliser la fusion de leurs protoplastes, afin d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse.

2.2 - UTILISATION DE LA FUSION DES PROTOPLASTES

Quand la réalisation des anastomoses est empêchée, la fusion des protoplastes peut permettre l'obtention de nouvelles associations génétiques entre diverses souches voire même espèces.

Les protoplastes sont des cellules sans paroi. Ceux-ci placés dans des conditions adéquat régénéreront leur paroi et redonneront une cellule viable puis un thalle. C'est donc avant la synthèse complète de cette paroi qu'il faudra tenter de faire fusionner les protoplastes en les maintenant en contact suffisamment longtemps.

2.2.1 - Aperçus bibliographiques

La fusion de protoplastes est de plus en plus réalisée chez les végétaux supérieurs pour la création de nouvelles variétés. Chez les microorganismes fongiques, elle commence à être utilisée plus largement.

Au sein de la même espèce : *Aspergillus nidulans*, en 1975 FERENCZY et son équipe (10) ont réalisé des fusions avec une fréquence de $2{,}5.10^{-3}$. Plus tard (9) ils ont obtenu des fusions interspécifiques chez deux couples de

microorganismes *Aspergillus flavus* x *A. niger* et *Penicillium frequentans* x *P. ramigena*. En 1979, KEVEI (30) obtient, par cette technique, des hybrides interspécifiques entre *A. nidulans* et *A. rugulosus*. De nombreux hybrides interspécifiques ont été obtenus grâce à la fusion de protoplastes par plusieurs auteurs, PEBERDY (53) entre *P. chryzogenum* et *P. cyaneo-fulvum*, par ANNE (1) entre *P. roqueforti* et *P. chrysogenum*.

Chez d'autres champignons, la réalisation de la fusion de leurs protoplastes a été possible par exemple chez *Geotrichum condidum* (FERENCZY, 1974) (8) chez *Mucor racemosus* (LASKER, 1980) (33).

Tous ces auteurs ont eu recours aux mêmes méthodes générales d'obtention des protoplastes et de fusion.

2.2.2 - Obtention des protoplastes

En tenant compte de tous les facteurs agissant sur l'état physiologique des protoplastes, MALARD (44) a mis au point chez *Aspergillus oryzae* un protocole expérimental lui permettant d'obtenir une bonne fréquence de protoplastes afin de réaliser leur fusion. Nous avons retenu ce protocole qui est décrit en détail dans la première partie. Cette méthode nous a permis d'obtenir un rendement en protoplaste de 10^6 à $1{,}6.10^7$ protoplastes par millilitre à partir de 100 à 300 mg de mycélium âgé de 24 heures. Ces protoplastes ont un diamètre allant de 4 µ à 14 µ, et un taux de viabilité supérieur à 80%. Le taux de protoplastes viables a été déterminé en les colorant au bleu coton C4B. Par cette méthode les protoplastes viables ont un cytoplasme qui se colore fortement en bleu, et le cytoplasme des protoplastes morts reste incolore.

2.2.3 - Réalisation de la fusion des protoplastes

Pour réaliser la fusion des protoplastes obtenus, nous avons utilisé le polyéthylène glycol (P.E.G.) (PM : 6000) assurant leur contact et permettant leur agglutination. Nous avons procédé comme indiqué précédemment dans le chapitre matériel et méthodes.

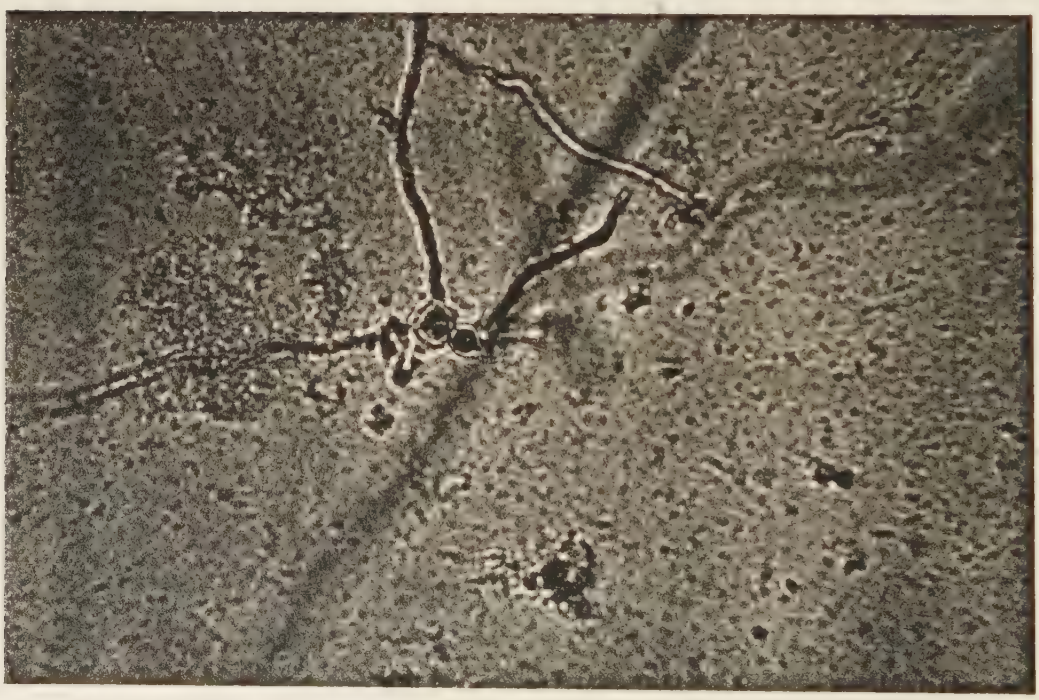
a) Fusions de protoplastes provenant de souches conduisant à des thalles prototrophes par la voie des anastomoses.

Pour tester l'aptitude à fusionner des protoplastes provenant de deux souches, nous nous sommes placés dans des conditions où l'incompatibilité

Photo n° 9 - Agglutination de protoplastes par le P.E.G.

4,6 µ

Photo n° 10 - Fusion de deux protoplastes provenant de deux mutants auxotrophes complémentaires, engendrant un thalle prototrophe (coloration au bleu coton).



14 µ

cellulaire ne peut pas être mise en cause. Nous avons choisi pour cela deux mutants auxotrophes ayant fourni sans problème des thalles prototrophes en confrontation (anastomoses). Ce sont les mutants 41.5 issu de la souche 115.33 et AMY1 provenant de la souche 102.07. A partir de 100 mg de mycélium de 24 heures nous avons recueilli 6.10^6 protoplastes par ml pour le mutant 41.5 et 2.10^6 protoplastes par ml pour le mutant AMY1. Le taux de viabilité de ces deux types de protoplastes s'est avéré supérieur à 80%. Avant de réaliser leur fusion, nous avons étudié l'effet du P.E.G. sur ces protoplastes. Pour cela, un comptage au microscope est effectué avant et après l'addition de la solution fusiogène. Nous remarquons que le P.E.G. provoque une perte de protoplastes de 10% et permet de plus l'agglutination de 2 à 20 protoplastes par agrégat (photo n° 9).

En tenant compte de l'ensemble de ces résultats, nous avons réuni dans un même tube 10^6 protoplastes de chacun des deux mutants. Après traitement fusiogène, ce mélange est étalé sur le milieu minimum stabilisé (30% de saccharose) supplémenté et non supplémenté par l'un ou l'autre des facteurs de croissance requis, ainsi que sur le milieu PDA stabilisé. Parallèlement, afin de nous assurer que des conidies ne contaminent pas nos suspensions de protoplastes, nous avons étalé le mélange des deux types de protoplastes ainsi que les suspensions des protoplastes de chacun des mutants sur le milieu minimum non stabilisé mais supplémenté par l'un ou l'autre des facteurs de croissance requis, ainsi que sur le milieu PDA non stabilisé. En effet, sur des milieux non stabilisés les protoplastes éclatent, seules les conidies sont susceptibles de se développer. Aucun thalle n'est apparu dans ces conditions, donc aucune conidie n'était présente dans les suspensions de protoplastes.

Six jours après étalement, nous avons noté l'apparition de thalles prototrophes sur le milieu minimum stabilisé. La fréquence d'obtention de ces thalles prototrophes est de 10^{-3}. En absence de conidies, l'obtention de ces thalles prototrophes ne peut donc être expliquée que par la fusion entre les deux types de protoplastes mis en présence dans le P.E.G. Par conséquent, la fusion de protoplastes s'avère possible dans ces conditions (photo n° 10).

Les produits prototrophes ont été prélevés un à un sous le stéréomicroscope afin d'être analysés.

b) Fusion de protoplastes provenant de souches n'ayant jamais engendré de thalles prototrophes par confrontation.

Plusieurs tentatives se sont révélées totalement infructueuses. Nous n'avons jamais observé de produits prototrophes pouvant provenir d'une fusion entre deux auxotrophes n'ayant jamais donné de prototrophes après confrontation (anastomoses). Par exemple : P2.6 x 34.8 provenant respectivement des souches 102.07 et 115.33 ou même AP4 x AMY1 provenant tous les deux de la souche 102.07.

En conclusion, nous pouvons affirmer que l'empêchement d'engendrer un thalle prototrophe entre ces souches n'est pas dû à des obstacles opposés par les parois mais plus vraisemblablement au défaut de viabilité des produits de fusion consécutif à l'incompatibilité cellulaire.

Nous constatons de plus que cette incompatibilité n'est pas liée constamment à l'origine différente des souches de départ. En effet, certains mutants issus respectivement des souches 102.07 et 115.33 ont conduit, après fusion de leurs protoplastes, à des lignées prototrophes. C'est le cas, par exemple, de AP3 issu de 102.07 et 41.5 issu de 115.33 et de AMY1 (102.07) associé à 34.8 (115.33). Il est donc envisageable que cette incompatiblité soit apparue lors des évènements mutationnels nécessaires à l'obtention des lignées auxotrophes ou modifiées dans leur aptitude à synthétiser l'αCA.

L'obtention de thalles prototrophes à la suite de confrontation (anastomoses) ou après fusion de protoplastes, nous incite à nous poser quelques questions :

- d'une part, sur la nature de ces produits, provènant ou non de l'accomplissement du cycle parasexuel, et dans l'affirmative sur la caractérisation d'une ou plusieurs étapes de ce cycle ;
- d'autre part, sur l'influence de la cohabitation de deux informations génétiques différentes sur la production de l'acide α-cyclopiazonique.

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons entrepris l'analyse des thalles prototrophes obtenus.

2.3 - ANALYSE DES THALLES PROTOTROPHES

2.3.1 - Hypothèses de travail

L'apparition de thalles prototrophes à la suite de confrontations ou de fusion de protoplastes peut être le résultat de divers évènements :

- une réversion ou une adaptation des lignées auxotrophes ;
- une complémentation nutritionnelle réciproque : une souche auxotrophe pouvant synthétiser et diffuser à travers le milieu de culture des substances nutritives nécessaires à la croissance de l'autre auxotrophe et inversement ;
- l'hétérocaryose : un thalle prototrophe peut être induit par la mise en commun et le fonctionnement dans un même cytoplasme des noyaux de deux mutants auxotrophes ;
- la diploïdie : les deux noyaux présents dans le cytoplasme peuvent fusionner et donner des lignées diploïdes prototrophes, et éventuellement stables, si les mutations sont récessives ;
- une recombinaison : les lignées diploïdes peuvent redonner des individus haploïdes parmi lesquels seuls des individus recombinés seront prototrophes.

Dans les cas que nous proposons d'analyser, plusieurs de ces évènements peuvent être rapidement éliminés.

Nous avons travaillé avec des souches parentales auxotrophes stables. Nous n'avons jamais observé l'apparition de révertants à partir de ces souches. D'autre part, s'il s'agissait d'une complémentation nutritionnelle réciproque, elle devrait intéresser l'ensemble de la zone de contact et non pas se localiser en certains endroits seulement. D'ailleurs, des semis prélevés dans la zone de contact en dehors des secteurs de croissance ne se sont pas développés sur milieu minimum.

Il reste pour expliquer la prototrophie une des trois étapes du cycle parasexuel. Dans le cas que nous étudions, la fréquence d'apparition de thalles prototrophes par confrontation est importante (environ 1 par boîte de confrontation pour un couple compatible) et de 10^{-3} par fusion de protoplastes. Chez *A. oryzae* ISHITANI (26, 27) a décrit l'apparition spontanée de diploïdes avec des fréquences de l'ordre de 10^{-6}. Ceci est très faible par rapport à ce que nous

observons. Nous pouvons donc penser que nos prototrophes sont des hétérocaryons. La suite de ce travail devrait nous le confirmer.

2.3.2 - Stabilité des hétérocaryons

Sachant que le milieu minimum exerce une pression sélective en faveur du maintien de l'association nucléaire et assure l'entretien du stade hétérocaryotique, la stabilité des hétérocaryons que nous avons obtenus a été testée sur ce milieu.

Pour cela, nous avons prélevé à partir des zones de croissance prototrophes des boutures que nous avons repiquées sur le milieu minimum et sur le milieu PDA. Ceci correspond à la première génération. Sur le milieu minimum ces boutures engendrent des thalles qui croissent à la même vitesse que leurs thalles d'origine et commencent à différencier des conidies en abondance vers le 9ème jour. Nous avons résumé dans le tableau n° 14 les caractéristiques biologiques de ces thalles prototrophes.

Nous notons une diversité assez importante des phénotypes des individus recueillis.

2.3.3 - Analyse des conidies des générations successives

Pour réaliser cette analyse, nous avons récolté les conidies produites sur milieu minimum au premier repiquage (1ère génération) ou au $n^{ème}$ repiquage ($n^{ème}$ génération). Ces conidies sont clonées sur PDA et après trois jours de croissance, transférées une à une sur le milieu minimum et sur le milieu minimum supplémenté par l'un ou l'autre des facteurs de croissance requis par les confrontants. Nous avons ainsi pu évaluer la fréquence des différents types nucléaires présents parmi les conidies. Les résultats sont réunis dans le tableau n° 15.

2.3.4 - Discussion des résultats et conclusion

Si les thalles prototrophes que nous avons obtenus sont réellement des hétérocaryons, nous devrions retrouver après analyse de leurs conidies, uniquement l'un ou l'autre des deux génotypes parentaux. Or, les résultats montrent qu'après la première et la sixième générations, nous retrouvons toujours des conidies ayant soit l'un, soit l'autre des génotypes parentaux, mais aussi des conidies prototrophes. Des sous-clonages réguliers des thalles issus chacun d'une seule

TABLEAU N° 14 - Caractéristiques biologiques, après neuf jours de culture, des hétérocaryons obtenus

Hétérocaryons	Phénotypes sur PDA	Croissance (diamètre en mm)	
		sur PDA	sur MM
P2.6 x AP3	Mycélium abondant, vert	66	49
P2.6 x AP4	Mycélium abondant, vert	65	50
41.5 x 34.8	Mycélium rare, vert	65	43
22.2 x 54.6	Mycélium rare, sectorisé vert et blanc	62	42
40.5 x 4.6	Mycélium rare, blanc	48	37
40.5 x 82.5	Mycélium rare, beige	46	38
41.5 x 4.6	Mycélium rare, beige	58	45
41.5 x 54.6	Mycélium peu abondant, vert	59	43
41.5 x 22.2	Mycélium rare, blanc	62	42
41.5 x 40.5	Mycélium rare, beige	62	46
41.5 x 82.5	Mycélium rare, vert	60	46
54.6 x 82.5	Mycélium rare, beige	62	48
54.6 x 40.5	Mycélium rare, blanc	65	43
54.6 x 4.6	Mycélium rare, beige	58	40
40.5 x 34.8	Mycélium rare, beige	64	49
40.5 x 22.2	Mycélium rare, beige	65	38
22.2 x 34.8	Mycélium rare, vert	55	43
22.2 x 4.6	Mycélium abondant, sectorisé vert et blanc	62	45
22.2 x 82.5	Mycélium rare, vert	62	45
AMY1 x 34.8	Mycélium abondant, vert	48	50
AMY1 x 41.5	Mycélium abondant, vert	45	50
AMY1 x 82.5	Mycélium abondant, vert	68	34
P2.6 x 54.6	Mycélium abondant, vert	55	42
P2.6 x 4.6	Mycélium abondant, vert	47	47
AP4 x 54.6	Mycélium abondant, vert	71	52
AP3 x 41.5	Mycélium rare, vert	67	47

TABLEAU N° 15 - Proportions des conidies parentales et hétérocaryotiques

Croisements	Première génération			Sixième génération		
Génotype 1 x Génotype 2	Hétéro-caryon	Génotype 1	Génotype 2	Hétéro-caryon	Génotype 1	Génotype 2
P2.6 x AP3	1%	31%	68%	1%	27%	72%
P2.6 x AP4	1%	22%	77%	1%	24%	75%
41.5 x 34.8	1%	23%	76%	1%	25%	74%
22.2 x 54.6	1%	72%	27%	1%	75%	24%
40.5 x 4.6	2%	58%	40%	2%	64%	34%
40.5 x 82.5	0%	14%	86%	1%	17%	82%
41.5 x 4.6	1%	94%	5%	1%	92%	7%
41.5 x 54.6	1%	32%	67%	2%	40%	58%
41.5 x 22.2	1%	31%	68%	1%	35%	64%
41.5 x 40.5	1%	59%	40%	2%	65%	23%
41.5 x 82.5	2%	64%	34%	1%	60%	39%
54.6 x 82.5	1%	7%	92%	1%	10%	89%
54.6 x 40.5	2%	86%	12%	2%	82%	16%
54.6 x 4.6	0%	53%	47%	1%	50%	49%
40.5 x 34.8	3%	37%	60%	2%	40%	58%
40.5 x 22.2	2%	4%	94%	3%	6%	91%
22.2 x 34.8	1%	79%	20%	1%	84%	15%
22.2 x 4.6	1%	82%	17%	1%	80%	19%
22.2 x 82.5	1%	81%	18%	1%	75%	24%
AMY1 x 34.8	0%	95%	5%	1%	93%	6%
AMY1 x 41.5	1%	93%	6%	1%	90%	9%
AMY1 x 82.5	0%	95%	5%	1%	90%	9%
P2.6 x 54.6	0%	63%	37%	1%	60%	39%
P2.6 x 4.6	0%	60%	40%	1%	50%	49%
AP4 x 54.6	0%	65%	35%	2%	60%	38%
AP3 x 41.5	1%	10%	89%	1%	7%	92%

de ces conidies prototrophes ont montré que les deux types nucléaires parentaux sont présents en association chez ces conidies. L'existence de ces conidies prototrophes peut être expliquée par le fait que chez *A. oryzae* les conidies sont plurinucléées. Lors de leur formation un noyau au moins migre de la vésicule vers le stérigmate puis dans la conidie qui se forme, ce noyau subit des divisions mitotiques conduisant à 2 puis 4 noyaux frères. Chez *A. oryzae* ISHITANI et SAKAGUCHI (25) ont décrit des cas ou, deux noyaux ou plus, étaient susceptibles de migrer de la vésicule vers la conidie en formation. Dans ce cas, chaque noyau se divise indépendamment. La conidie renferme alors des noyaux différents. Dans notre cas, une telle situation peut expliquer la présence de conidies prototrophes.

L'analyse des conidies de la première génération montre que la fréquence de ces conidies prototrophes ne dépasse pas 3%. Ce résultat est en accord avec ceux de MALARD (44) et de THORBEK (71) qui ont obtenu des fréquences variables entre 1 à 5%. Par contre, ISHITANI et SAKAGUCHI (26) observent des fréquences allant de 15 à 20% de conidies prototrophes. Ceci pourrait être dû aux souches d'*A.oryzae* qu'ils ont utilisées qui contenaient un nombre moyen de noyaux par conidie très supérieur (8 à 20) à celui de nos souches ($\simeq$ 4).

Une autre remarque importante est à faire. Nous observions un important déséquilibre dans les proportions des génotypes parentaux recueillis. Au sein d'un même hétérocaryon ce déséquilibre est toujours dans le même sens après six générations. Certains génotypes parentaux représentent jusqu'à 95% de l'effectif total. Ce phénomène a aussi été noté par MALARD (44) et par THORBEK (71). Deux hypothèses sont susceptibles d'en rendre compte :

a) Taux de germination des conidies parentales sur le milieu complet

Lors des clonages, seules sont prélevées les conidies ayant germé. Par conséquent, le parent dont les conidies possèdent un taux de germination supérieur à l'autre sera avantagé. C'est le cas par exemple de la confrontation AP3 x 41.5.

Mais comme le montre le tableau n° 15, certains parents ayant un faible pourcentage de germination (AP4 et AP3) sont les plus fréquents au sein de l'hétérocaryon. Exemple, AP4 x P2.6 et AP3 x P2.6. De plus, nous constatons qu'un même parent peut être tantôt le plus fréquent et tantôt le plus rare selon son partenaire. Exemple : 54.6 confronté à 82.5 ou à 40.5. Par conséquent, cette hypothèse nous paraît exclue.

b) Niveau de complémentation

Le niveau de complémentation nécessaire pour induire une croissance sur le milieu minimum avantagerait un génotype parental au détriment de l'autre.

Des prélèvements de fragments d'hyphes mycéliennes ont donné des résultats semblables à ceux obtenus à partir de prélèvements de conidies. Nous notons une plus forte proportion de cellules végétatives hétérocaryotiques que de conidies hétérocaryotiques qui peut s'expliquer par l'existence d'un plus grand nombre de noyaux dans les articles mycéliens que dans les conidies. De plus, dans la plupart des cas, comme pour les conidies, un parent est majoritaire. Ce déséquilibre observé aussi au niveau des cellules mycéliennes ne peut s'expliquer que par des niveaux de complémentation différents de l'un et l'autre des confrontants.

L'analyse des conidies de la sixième génération montre que les proportions des conidies parentales et des conidies prototrophes vont dans le même sens que celles de la première génération. Ceci prouve que tous ces thalles étaient et sont toujours de nature hétérocaryotique. Le résultat des sous-clonages réguliers des conidies prototrophes prouve que ces conidies sont aussi de nature hétérocaryotique et que ce stade n'est pas encore dépassé.

Les thalles prototrophes hétérocaryotiques qui ont été entretenus parallèlement sur milieu minimum et sur milieu PDA présentent des différences dans les proportions de conidies hétérocaryotiques recueillies (tableau n° 16). Nous notons un plus grand nombre de conidies prototrophes en provenance de PDA que de milieu minimum. Ceci peut être expliqué par le fait que sur milieu minimum et au sein d'un même thalle hétérocaryotique, des rameaux mycéliens contenant soit l'un, soit l'autre, des deux types nucléaires parentaux, ne vont pas pouvoir croître. Par contre, sur milieu PDA, ces rameaux mycéliens homocaryotiques vont pouvoir se développer et auront la possibilité d'entrer en contact entre eux et de s'anastomoser de nouveau donnant naissance à des filaments hétérocaryotiques susceptibles de différencier des conidies prototrophes. Pour appuyer une telle hypothèse, certaines expériences complémentaires sont nécessaires. En effet, nous n'avons aucune preuve nous permettant de soutenir d'une part, qu'il y a des proportions différentes, sur milieu PDA et sur milieu minimum, de rameaux uni ou bi-parentaux ; d'autre part que le milieu PDA rend les anastomoses plus fréquentes. En absence de telles informations cette hypothèse ne paraît pas convaincante.

TABLEAU N° 16 - Fréquence des conidies hétérocaryotiques à la 6ème génération chez les thalles prototrophes

Confrontations	Thalles provenant de MM	Thalles provenant de PDA
P2.6 x AP3	1%	7%
P2.6 x AP4	1%	5%
41.5 x 34.8	1%	5%
22.2 x 54.6	1%	4%
40.5 x 4.6	2%	4%
40.5 x 82.5	1%	5%
41.5 x 4.6	1%	7%
41.5 x 54.6	2%	7%
41.5 x 22.2	1%	3%
41.5 x 40.5	2%	6%
41.5 x 82.5	1%	5%
54.6 x 82.5	1%	4%
54.6 x 40.5	2%	7%
54.6 x 4.6	1%	5%
40.5 x 34.8	2%	6%
40.5 x 22.2	3%	7%
22.2 x 34.8	1%	5%
22.2 x 4.6	1%	4%
22.2 x 82.5	1%	4%
AMY1 x 34.8	1%	7%
AMY1 x 41.5	1%	8%
AMY1 x 82.5	1%	5%
P2.6 x 54.6	1%	8%
P2.6 x 4.6	1%	6%
AP4 x 54.6	2%	7%
AP3 x 41.5	1%	5%

Il nous semble plus simple de penser que les conidies formées sur le milieu PDA possèdent un plus grand nombre de noyaux. Elles peuvent donc associer plus fréquemment les deux types nucléaires.

CHAPITRE III : INFLUENCE DE L'HETEROCARYOSE SUR LA PRODUCTION D'αCA

Nous venons de décrire qu'après confrontations ou fusions de protoplastes, des thalles prototrophes apparaissaient et donnaient naissance dans certaines proportions à des conidies prototrophes capables de maintenir cet état. Les souches parentales que nous avons utilisées possédaient ou non l'aptitude à produire l'acide α-cyclopiazonique. La question se pose donc de savoir ce que devient cette aptitude à synthétiser ou non la toxine chez les produits hétérocaryotiques que nous avons isolés.

3.1 - PRODUCTION D'αCA PAR LES THALLES HETEROCARYOTIQUES

3.1.1 - Mesure de cette production

Nous avons testé l'aptitude de chacun des thalles prototrophes recueillis à produire l'αCA. Pour cela, nous avons utilisé, dans un premier temps, les tests biologiques mis au point précédemment, à savoir le pouvoir bactéricide de la toxine et la mise en évidence des variations de pH dans le milieu M par virage du rouge de phénol.

L'analyse des extraits a été nécessaire dans certains cas où les résultats des tests biologiques n'étaient pas clairs, ces tests n'étant pas d'une très grande sensibilité.

Les résultats obtenus sont notés dans le tableau n° 17.

3.1.2 - Discussion des résultats

a) Confrontations entre souches productrices d'αCA issues de la souche 102.07.

Ce type de confrontation mettant en jeu des auxotrophes producteurs de la toxine tous issus de la même souche productrice (102.07) n'a engendré que des hétérocaryons producteurs d'αCA. Ce résultat était prévisible. Lors de la réunion dans un même cytoplasme de deux génomes codant chacun pour la production de la toxine, l'expression finale ne peut être que la synthèse de cette toxine.

TABLEAU N° 17 - Influence de l'hétérocaryose sur la production d'αCA

			Producteurs d'αCA				Non producteurs d'αCA						
		Souches mères		102.07			115.33		TB500*			32.1*	
		Auxotrophes	AMY1	AP3	AP4	P2.6	34.8	41.5	4.6	40.5	82.5	22.2	54.6
Producteurs d'αCA	102.07	AMY1					P	P			P		
		AP3				P		NP					
		AP4				P							P
		P2.6							P				P
Non producteurs d'αCA	115.33	34.8						NP	▨	NP	▨	NP	
		41.5							NP	NP	NP	NP	NP
	TB500*	4.6								NP	▨	NP	NP
		40.5									NP	NP	NP
		82.5										NP	NP
	32.1*	22.2											NP
		54.6											

Légende : P : Hétérocaryon produisant l'αCA

NP : Hétérocaryon ne produit pas l'αCA

□ : Pas d'obtention d'un thalle prototrophe

▨ : Auxotrophes non confrontés parce qu'ils ont la même auxotrophie

* : Les souches TB500 et 32.1 non productrices d'αCA proviennent de 102.07

b) Confrontations entre souches non productrices d'αCA de même origine.

Ces confrontations ont été réalisées d'une part entre auxotrophes issus de la souche 115.33 d'autre part entre auxotrophes issus de mutants non producteurs obtenus à partir de la souche 102.07. Toutes ces confrontations ont donné naissance uniquement à des hétérocaryons ne produisant pas d'acide α-cyclopiazonique. Nous pouvons donc penser que les individus auxotrophes confrontés sont bloqués à une même étape de la chaîne de biosynthèse de l'αCA. La réunion de leurs génomes dans un même cytoplasme ne donnera pas de complémentation.

c) Confrontations entre souches non productrices d'αCA d'origines différentes.

Dans ce cas, une cinquantaine d'hétérocaryons provenant de 13 confrontations différentes, ont été analysés. Nous n'avons recueilli que des individus non producteurs de toxine.

Les auxotrophes confrontés ont des origines différentes, on peut donc imaginer que la production d'αCA est bloquée à des niveaux différents de la chaîne de biosynthèse. Dans ce cas, une complémentation pourrait avoir lieu entre deux génomes réunis dans les hétérocaryons. Ces individus seraient alors capables de produire la toxine. Mais, les résultats obtenus montrent que ce n'est pas le cas, et que la production d'αCA est vraisemblablement bloquée au même niveau de la chaîne de biosynthèse chez tous ces auxotrophes non producteurs. Ces résultats nous permettent de renforcer l'hypothèse déjà émise lors de l'obtention de mutants modifiés dans leur capacité à produire la toxine, à savoir que la production d'αCA est commandée par un petit nombre de gènes.

d) Confrontations entre souches productrices et non productrices d'αCA.

Toutes les confrontations, à une seule exception près, ont engendré des hétérocaryons producteurs. Ces résultats sont à rapprocher des observations faites sur les proportions des conidies de type parental formées par ces hétérocaryons. Les conidies du type parental producteur prédominent dans tous les cas, sauf un. Cette exception concerne précisément l'hétérocaryon non producteur issu de la confrontation AP3 x 41.5. En effet, si l'on se réfère au tableau n° 12, le clonage de 130 conidies provenant de ce thalle donne 1% de conidies hétérocaryotiques, 10% de conidies parentales AP3 producteur et 89% de conidies du type parental 41.5 non producteur d'αCA.

De même, le prélèvement de fragments d'hyphes mycéliennes comprenant une à deux cellules, a donné un résultat semblable à celui obtenu à partir des prélèvements de conidies, avec une augmentation du nombre de cellules hétérocaryotiques. Le résultat est le suivant : 18% de cellules hétérocaryotiques
64% de cellules du type 41.5
18% de cellules du type AP3

Notons toutefois que la production de toxine est étudiée sur le milieu M. Sur ce milieu les individus auxotrophes sont incapables de croître. Seul l'hétérocaryon le fait. Les cellules hétérocaryotiques émettent très vraisemblablement des métabolites susceptibles d'induire la croissance des cellules auxotrophes. Par conséquent, la production ou la non production d'αCA par un hétérocaryon peut dépendre assez étroitement de la fréquence des cellules uniparentales présentes chez celui-ci. Si les cellules uniparentales productrices de la toxine sont rares, il y aura une faible production d'αCA qui par nos tests biologiques ne sera pas détectable.

En conclusion, l'aptitude d'un hétérocaryon à produire l'αCA dépend de la proportion des génotypes parentaux, qui est déterminée génétiquement (54). Autrement dit, la synthèse de cette mycotoxine dépend du niveau de complémentation nécessaire à l'induction de la croissance sur le milieu minimum.

Concernant ce type de confrontation, nous avons envisagé de comparer la quantité d'αCA produite par chacun des parents producteurs AMY1, AP4 et P2.6, à celle produite par certains hétérocaryons engendrés par confrontation entre ces mêmes producteurs et des non producteurs. Pour cela, nous avons préparé des erlens contenant chacun 75 ml soit de milieu M liquide, soit de M liquide supplémenté avec le facteur de croissance requis par chacun des parents producteurs. Nous avons ensuite ensemencé chacun de ces erlens par 5.10^5 conidies provenant de l'un des thalles hétérocatyotiques ou de l'un des thalles parentaux producteurs d'αCA. Après 21 jours d'incubation à 23°C, nous avons extrait la toxine et parallèlement nous avons prélevé 130 hyphes mycéliennes à partir de chacun des thalles hétérocaryotiques. Ainsi, nous avons déterminé les proportions des cellules mycéliennes hétérocaryotiques et celle des cellules contenant l'un ou l'autre des types nucléaires parentaux. Nous avons résumé les résultats obtenus dans le tableau n° 18.

TABLEAU N° 18 - Proportions des hyphes hétérocaryotiques et uniparentales après 21 jours de culture sur milieu M liquide

Hétérocaryons		Hyphes hétérocaryotiques	Hyphes parentales productrices d'αCA	Hyphes parentales non productrices d'αCA
P	NP			
AMY1 x 34.8		5%	85%	10%
AMY1 x 41.5		7%	81%	12%
P2.6 x 54.6		7%	54%	39%
AP4 x 54.6		9%	51%	40%

Légende : P = Producteur ; NP = Non producteur

Ces résultats montrent que le déséquilibre existant dans les proportions des génotypes parentaux va toujours dans le même sens que ceux observés à partir d'isolements de conidies ou de prélèvements d'hyphes mycéliennes sur milieux gélosés. Ceci conforte donc l'idée que ces proportions sont déterminées génétiquement.

L'analyse quantitative par RMN ^{1}H nous a permis de déterminer la quantité d'αCA présente dans chacun des extraits. L'ensemble des résultats est représenté dans le tableau n° 19.

TABLEAU N° 19 - Quantité d'αCA dans les extraits de milieu de culture des hétérocaryons et des parents producteurs

Hétérocaryons	Production d'αCA (en %) par le parent producteur	Production d'αCA (en %) par l'hétérocaryon
AMY1 x 34.8	7%	3,9%
AMY1 x 41.5	7%	4,2%
P2.6 x 54.6	8,7%	6,3%
AP4 x 54.6	2,1%	6,4%

Prenons par exemple le cas de l'hétérocaryon AP4 x 54.6 qui produit 6,4% d'αCA (6,4 mg dans 100 mg d'extrait brut). Le parent producteur AP4 dont il est issu produit 2,1% d'αCA.

Au sein de l'hétérocaryon, nous avons dénombré (tableau n° 18) 51% de cellules correspondant au parent producteur AP4. Nous pouvons calculer la quantité théorique d'αCA susceptible d'être produite par ces 51% de cellules AP4 au sein de l'hétérocaryon. Elle serait de $\frac{2,1 \times 51}{100}$ = 1,07 mg d'αCA pour 100 mg d'extrait brut, soit 1,07 %. Or, nos résultats indiquent que cet hétérocaryon produit 6,4% d'αCA. Cette valeur est nettement supérieure à celle du parent producteur (AP4).

L'application de ce même raisonnement aux autres hétérocaryons donne les résultats figurant dans le tableau n° 20.

TABLEAU N° 20 - Production théorique d'αCA liée uniquement à la présence des cellules parentales productrices au sein de chacun des hétérocaryons

Hétérocaryons	Proportion de cellules parentales productrices au sein de l'hétérocaryon	Quantité d'αCA produite par les cellules parentales productrices
AMY1 x 34.8	85%	5,95%
AMY1 x 41.5	81%	5,67%
P2.6 x 54.6	54%	4,70%
AP4 x 54.6	51%	1,07%

En comparant respectivement la quantité d'αCA produite par chaque hétérocaryon, à celle produite par le parent producteur correspondant, nous constatons que les deux hétérocaryons AMY1 x 34.8 et AMY1 x 41.5 produisent moins d'αCA que le parent producteur AMY1, alors que les deux hétérocaryons P2.6 x 54.6 et AP4 x 54.6 produisent plus d'αCA que les parents producteurs respectifs P2.6 et AP4.

Pour expliquer l'existence des hétérocaryons hypoproducteurs d'αCA, il est possible de faire plusieurs hypothèses.

D'une part, une partie d'un produit précurseur de la toxine, émis par le parent producteur, serait métabolisée par le parent non producteur pour la réalisation d'une autre fonction que le biosynthèse de l'αCA. D'autre part, au cours de cette thèse, nous avons décrit que l'addition dans le milieu de culture de tryptophane ou de pyrophosphate de diméthylallyl (DMAPP) exogène, provoque une chute de la production d'αCA par rétroinhibition. Nous pouvons alors imaginer que l'accumulation de l'un ou l'autre de ces précurseurs par les parents non producteurs (41.5 ou 34.8) déclencherait ce phénomène de rétroinhibition chez les

parents producteurs, induisant ainsi chez ces derniers une diminution de la production de la toxine.

L'obtention d'hétérocaryons hyperproducteurs peut être interprétée par la suppression des systèmes régulateurs (rétroinhibition, repression) des parents producteurs par les parents non producteurs.

Une seconde hypothèse peut être émise. Le parent non producteur contenu dans l'hétérocaryon, accumule un précurseur qu'il est incapable de transformer.

La possibilité qu'il aurait d'utiliser l'enzyme correspondante issue de la chaîne de biosynthèse du parent producteur pourrait lever ce blocage. Pour qu'il y ait dans ce cas hyperproduction il est nécessaire que la quantité de cette enzyme ne soit pas limitante.

CONCLUSION

Comme nous l'avons montré, chez nos souches d'*Aspergillus oryzae* la synthèse d'hétérocaryons par la voie des anastomoses végétatives ou par fusion de protoplastes est réalisable en absence d'incompatibilité cellulaire.

D'autre part, les confrontations réalisées entre auxotrophes complémentaires non producteurs d'αCA issus de la même souche ou de souches d'origines différentes, n'ont engendré que des hétérocaryons non producteurs de cette toxine. Ceci implique qu'il n'y a pas eu complémentation entre eux et que la production d'αCA chez ces individus non producteurs, est probablement bloquée à un même niveau de la chaîne de biosynthèse. D'où l'hypothèse que la production d'αCA est codée par un petit nombre de gènes.

L'analyse des résultats des confrontations réalisées entre individus producteurs d'αCA et individus non producteurs nous a permis de conclure, d'une part, que chez ces hétérocaryons, c'est le génotype producteur qui s'exprime. Le génotype non producteur est donc probablement non fonctionnel. D'autre part, la comparaison entre la confrontation AP3 x 41.5 et toutes les autres, laisse à penser que la correction des auxotrophies par complémentation internucléaire est moins exigeante que la correction de la production d'αCA. La croissance est possible alors que la production d'αCA peut être indétectable.

Le dosage de l'αCA, dans les extraits de milieux de culture de certains hétérocaryons obtenus à la suite de ce type de confrontation, montre qu'on obtient des hétérocaryons hyperproducteurs et des hétérocaryons hypoproducteurs d'αCA.

La réalisation de l'hétérocaryose permet donc d'apporter des informations sur les phénomènes génétiques intervenant dans la production de l'acide α-cyclopiazonique. Ces informations ne sont pourtant que très partielles dans la mesure où chez *A. oryzae* nous n'avons pas pu dépasser le stade hétérocaryotique qui s'avère stable.

A la lumière de nos résultats, il semble clair que l'obtention du stade diploïde ou d'individus recombinés apporterait des données plus précises sur les interactions génétiques entre les différents génomes confrontés quant à la production d'αCA.

La difficulté réside donc en premier lieu, dans le passage de l'état hétérocaryotique à l'état diploïde puis recombiné. En effet, nous avons montré que le stade hétérocaryotique était encore maintenu chez nos souches jusqu'à la sixième génération. Par ailleurs, en 1956 ISHITANI et ses collaborateurs (26, 27) ont montré que chez *A. oryzae* la fréquence d'obtention spontanée de diploïdes est très faible ($\simeq 10^{-6}$) et que ces diploïdes n'engendrent que très rarement des recombinés haploïdes. Chez de nombreuses espèces ayant des conidies uninucléées comme *A. nidulans*, la diploïdie entraîne une augmentation de la taille des conidies. Ce phénomène n'a pas été observé chez *A. oryzae* : ISHITANI (28) a constaté que la diploïdie, attestée par le doublement de la quantité d'ADN par noyau, s'accompagne d'une diminution du nombre de noyaux par conidie.

En second lieu, une autre difficulté porte sur la distinction entre les stades hétérocaryotiques, diploïde voire même recombiné chez un organisme tel que *A. oryzae* dont toutes les conidies sont plurinucléées. L'apparition d'une lignée prototrophe après confrontation entre deux souches auxotrophes ne permet en aucun cas de trancher.

L'utilisation de confrontants auxotrophes marqués chacun en plus par un marqueur dominant (résistance dominante à un inhibiteur par exemple) est nécessaire pour détecter la diploïdie et permet donc d'éliminer l'hypothèse d'une reversion vers la prototrophie survenue chez l'un ou l'autre des parents. En effet, puisque nos auxotrophies sont recessives, elles n'auront aucune chance de

s'exprimer chez un diploïde. Il faudrait avoir au moins un marqueur dominant chez chacun des parents et les retrouver associés dans un même noyau pour prouver la diploïdie. En ce qui concerne les recombinés haploïdes, l'obtention d'haploïdes doublement auxotrophes, à partir de deux mutants simples serait cependant un très bon indice.

Au cours de ce travail, nous n'avons pas essayé d'induire la suite du cycle parasexuel. Nous nous sommes contentés d'étudier le plus précisément possible toutes les informations que pouvait nous apporter le stade hétérocaryotique.

L'obtention de diploïdes puis de recombinés et l'étude génétique de la production d'αCA chez ces individus seraient nécessaires pour compléter l'ensemble de ce travail. Diverses techniques ont été déjà utilisées pour dépasser le stade hétérocaryotique. Certains auteurs (26) (27) (21) ont remarqué chez chez *A.oryzae*, le traitement des conidies hétérocaryotiques par le rayonnement ultra-violet, induit la formation des diploïdes qui peuvent représenter jusqu'à 30% des survivants. MALARD (44) qui a réalisé ce même travail, en a obtenu 5% parmi les survivants. PUHALLA et MAYFIELD (55) ont montré qu'en soumettant un hétérocaryon instable de *Verticillium dahliae* à une température de 30°C, ils obtenaient des diploïdes. Dans le même ordre d'idée, les vapeurs de camphre (59) (2) semblent avoir des actions diploïdisantes.

D'autres travaux (40) (15) (11) (22) ont montré que l'étalement d'une suspension conidienne issue d'une souche diploïde sur un milieu complet contenant de la parafluorophenylalanine ou du bénomyl, augmentait la fréquence d'obtention des recombinés haploïdes.

Vu le temps imparti au déroulement de cette thèse, nous n'avons pas cherché à surmonter les difficultés certaines d'obtention d'auxotrophes marqués chacun en plus par une résistance à un inhibiteur, qui si elle est dominante, permettrait de différencier un diploïde d'un éventuel revertant vers la prototrophie. Par conséquent, nous n'avons pas envisagé d'induire artificiellement l'obtention de diploïdes. Nous avons préféré aborder plus particulièrement l'étude biologique et génétique de cette mycotoxine. Une telle approche à notre connaissance, n'avait pas encore été entreprise.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le champignon sur lequel nous avons travaillé : *Aspergillus oryzae* qui produit l'α-amylase est très utilisé dans l'industrie agro-alimentaire. Mais, la production d'une toxine, l'acide α-cyclopiazonique par certaines de ses souches fait que son utilisation n'est pas sans risque pour l'homme et les animaux. Effectivement, l'analyse que nous avons réalisée à partir d'extraits de milieux de culture des souches réputées productrices en nous servant des techniques de chromatographie en couches minces de silice, de spectrométrie ultra-violette et de RMN ^{1}H, prouve que ces extraits contiennent l'αCA. En chromatographie la présence d'αCA dans un extrait est mise en évidence par l'apparition sur la plaque de silice d'une tâche bleu-violet dont le Rf est compris entre 0,75 et 0,90. En spectrométrie dans l'ultra-violet, l'αCA est caractérisé par la présence sur le spectre de deux maxima d'aborption à 220 nm et à 280 nm. En RMN ^{1}H (qui permet en plus une analyse quantitative) l'apparition sur le spectre d'un certain nombre de pics correspondant exclusivement aux groupements chimiques constituant l'αCA, caractérise la présence de cette toxine dans un extrait. La toxicité de ce produit a été montrée chez plusieurs organismes par divers auteurs. Dans le but d'éviter une intoxication du consommateur, l'utilisation uniquement de souches exemptes d' αCA s'avère indispensable. Pour cela il est nécessaire de trouver un crible simple et précis permettant d'isoler facilement de telles souches. Ceci constitue une partie de notre travail. Nous avons pu mettre en évidence une relation directe entre la production de l'αCA et, d'une part l'inhibition de la croissance d'*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, d'autre part l'alcalinisation du milieu M favorisant la production de cette toxine.

La constance de cette corrélation nous a permis d'utiliser ces propriétés biologiques faciles à mettre en évidence pour différencier rapidement les souches sûrement productrices d'αCA de celles qui n'en produisent peu ou pas. Mais ce crible présente deux imperfections :

Tout d'abord sa sensibilité n'est pas très grande puisque plusieurs jours sont nécessaires à l'expression des propriétés biologiques indiquées. Ensuite, ce délai d'expression conduit à l'obligation d'une analyse des clones un à un, donc limite le nombre d'individus testés. Cependant, malgré ces deux inconvénients, il nous a été possible grâce à ce crible d'isoler des mutants αCA modifiés.

Nous pensons donc avoir atteint au moins en partie notre but, en offrant une possibilité de cribler relativement aisément des mutants affectés dans leur aptitude à produire l'αCA. Nous l'avons mise à profit, afin de sélectionner pour la suite de notre travail diverses souches productrices ou non productrices d'αCA ayant la même souche d'origine ou des souches d'origines différentes. C'est ainsi que nous avons pu obtenir des mutants non producteurs d'αCA à partir de la souche productrice 102.07, avec une fréquence de 3.10^{-4} et de même des mutants producteurs d'αCA à partir de la souche non productrice 115.33, avec une fréquence de 4.10^{-4}.

Les perspectives d'utilisations industrielles des souches d'*Aspergillus oryzae* en mélanges, et à un niveau plus fondamental, l'intérêt que nous portions à la caractérisation de nos mutants en relation avec les diverses étapes de la chaîne de biosynthèse, de l'acide α-cyclopiazonique,nous ont amené, en absence de reproduction sexuée, à tenter de réaliser une ou plusieurs étapes du cycle parasexuel. Nous avons ainsi synthétisé des hétérocaryons "forcés" à partir de souches présentant des auxotrophies complémentaires et des aptitudes semblables ou différentes à produire la toxine. L'analyse des secteurs prototrophes apparus, nous a permis de décrire un stade hétérocaryotique stable au moins jusqu'à la sixième génération. Nous avions pris la précaution de vérifier qu'il ne s'agissait pas d'une reversion de l'un ou l'autre des parents.

Au cours de cette étude, nous avons remarqué que certaines confrontations étaient incapables d'engendrer des hétérocaryons. La fusion des protoplastes provenant de ces souches présentant une incompatibilité, comparée à celle des protoplastes issus des souches ayant donné des descendants prototrophes par la voie des anastomoses, nous ont conduits à diverses conclusions :

- L'empêchement qu'ont certaines de nos souches confrontées deux à deux à donner naissance à des thalles prototrophes est dû à une incompatibilité cellulaire et non pas à une impossibilité de lyse des parois cellulaires lors de la formation des anastomoses.

- L'impossibilité d'engendrer des hétérocaryons n'est pas liée à l'origine des souches mais plutôt aux mutants confrontés. La cause de cette impossibilité est très certainement en relation avec les évènements mutationnels subis par les confrontants.

Le but de cette analyse était l'étude de l'effet de l'hétérocaryose sur la production de l'αCA. Pour cela, nous avons testé l'aptitude de chacun des hétérocaryons obtenus à produire cette toxine en nous servant du crible mis au point.

Les conclusions se résument de la façon suivante :

- Les confrontations entre souches non productrices de même origine n'engendrent que des hétérocaryons non producteurs. Ceci est facilement explicable par le fait que ces individus sont bloqués à la même étape de la chaîne de biosynthèse de l'αCA.

- Les confrontations entre mutants non producteurs provenant de souches d'origines différentes ne forment que des hétérocaryons non producteurs. Dans ce cas, nous aurions pu imaginer une complémentation entre ces deux types de souches. Ceci n'a pas été confirmé et renforce l'hypothèse selon laquelle la production de l'αCA est régie par un nombre de gènes restreint.

- Les confrontations entre souches productrices de même origine ou d'origines différentes conduisent toujours à des hétérocaryons producteurs.

- Enfin, les confrontations réalisées entre individus producteurs et non producteurs ont fourni, sauf dans un cas, des hétérocaryons producteurs d'αCA. L'analyse de ces derniers résultats montre que l'aptitude de chacun des hétérocaryons à produire l'αCA dépendrait des proportions des noyaux parentaux présents au sein de l'hétérocaryon. En effet, nous avons constaté que dans toutes les confrontations de ce type, il y a toujours un déséquilibre important dans les proportions des conidies parentales. Par conséquent, si les conidies du parent producteur d'αCA sont les plus fréquentes, l'hétérocaryon sera producteur d'αCA et dans le cas contraire, l'hétérocaryon sera non producteur.

En comparant la quantité d'αCA produite par chacun de ces hétérocaryons à celle produite par le parent producteur correspondant, nous avons fait apparaître que certains de ces hétérocaryons étaient hyperproducteurs d'αCA, d'autres hypoproducteurs.

L'analyse du stade hétérocaryotique a montré aussi qu'à une seule confrontation près, le caractère "production d'αCA" l'emporte toujours même quand le non producteur est représenté par 35% des noyaux (54.6 x AP4) : tableaux n° 15 et 17 ; 37% des noyaux (P2.6 x 54.6) et 40% des noyaux (P2.6 x 4.6). L'exception concerne la confrontation AP3 x 41.5 où les noyaux producteurs sont particulièrement rares, et la sensibilité du crible ne permet pas d'affirmer qu'il n'y a pas du tout d'αCA produit. Il nous semble donc hautement probable que le caractère"production d'αCA" se comporte comme un caractère dominant. L'analyse des individus diploïdes ou des recombinés haploïdes apporterait des informations plus précises à ce sujet.

Il s'avère donc nécessaire de poursuivre cette étude du cycle parasexuel. Sachant que chez *A. oryzae* l'obtention spontanée des diploïdes à partir des hétérocaryons, ou de recombinés haploïdes à partir des diploïdes sont des phénomènes très rares, il faudrait envisager de provoquer leur apparition par diverses techniques décrites dans la littérature. Nous n'avons pas engagé un tel travail, vu le temps qui nous était imparti, et aussi parce que nous ne disposions pas d'auxotrophes marqués par une résistance à des inhibiteurs de croissance. Car, si cette résistance est dominante, elle nous permettrait de différencier sans ambiguité un diploïde d'un éventuel revertant à la prototrophie.

En conclusion, la production d'αCA est donc contrôlée par des facteurs de l'environnement (milieu de culture, température, pH) mais aussi par des facteurs génétiques.

Ceci ouvre plusieurs perspectives pour la poursuite de cette étude.

L'augmentation de la sensibilité du crible que nous avons mis au point pourrait passer par une meilleure connaissance des conditions optimales de production de l'αCA d'une part et, d'autre part, par la caractérisation des précurseurs biochimiques accumulés chez les mutants non producteurs de cette toxine.

Toujours dans le même but, il est possible d'envisager l'étude de l'activité biologique de cette molécule. Nous l'avons abordée en mettant en évidence son action bactéricide. Actuellement, nos essais sont limités par les faibles rendements de production d'αCA *in vitro*. Le passage par la synthèse chimique de cette molécule permettrait d'envisager des études telles que l'analyse des mécanismes d'action de l'αCA dans des systèmes acellulaires (protéines, ribosomes..) par exemple et les possibilités de complexation avec certains ions métalliques.

Par ailleurs, dans le cadre génétique auquel nous nous sommes limités, l'utilisation de nouvelles souches, d'origines différentes et ayant accumulé d'autres mutations pourrait permettre de poursuivre l'analyse du cycle parasexuel (diploïdes, recombinés) et donner des informations plus précises.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ANNE J., EYSSEN H., DE SOMER P., 1976 - Somatic hybridisation of *Penicillium roquefortii* with *Penicillium chrysogenum* after protoplast fusion.
Nature 262 : 719-721.

(2) BARRON G.L., 1962 - The parasexual cycle and linkage relationships in the storage rot fungus *Penicillium expansum*.
Can. J. Bot. 40 : 1603-1613.

(3) BENNET T.J.W., VINNETT C.H. et GOYNES W.R.Jr., 1980 - Aspects of parasexual analysis in *Aspergillus parasiticus*.
Can. J. Microbiol. 26(6) : 706-713.

(4) BOUTIBONNE P., 1979 - A propos de l'activité antibactérienne de la Zéaralénone.
Can. J. Microbiol. 25 : 421-423.

(5) BOUTIBONNE P., 1979. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de quelques mycotoxines par utilisation de *Bacillus thuringiensis*.
Mycopathologia. 67 (1) : 45-50.

(6) CHU F.S., 1977 - Mode of action of mycotoxins and related compounds.
Adv. in appl. Microbiol. 22 : 83-143.

(7) DATTA S., 1967 - The role of Aspergilli in carcinogenesis.
Ind. J. Cancer, t. IV, p.412-426.

(8) FERENCZY L., KEVEI F., ZSOLT, 1974 - Fusion of fungal protoplasts.
Nature 248 : 793-794.

(9) FERENCZY L., KEVEI L. et SZEGEDI M., 1975 a - High frequency fusion of fungal protoplasts.
Experientia. 31 : 1028-1029.

(10) FERENCZY L., KEVEI F. et SZEGEDI M., 1975 b - Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts.
Experientia. 31 : 50-52.

(11) GARBER E.D. et BERAHAL, 1965 - Genetics of phytopathogenic fungi. XIV The parasexual cycle in *Penicillium expansum*. Genetics. 52 : 487-492.

(12) GIBEL W.K., WEGNER and WILDNER G.P., 1971 - Experimentelle untersuchungen Zior Frage einer Kanzerogenen Wirkung Von *Penicillium camemberti* var *Candidum*. Arch. Geschwlstforsch. 38 : 1-6.

(13) HAMON M., PELLERIN F., GUERNET M., MAHUZIER G., 1980 - Abrégé de Chimie analytique : Méthodes spectrales et analyses organiques. Edition Masson. Tome 3. p.102-164.

(14) HARRY B. GRAY et GILBERT P. HAIGHT, 1973 - Principes de Chimie. Edition française dirigée par Jacques R. CHRETIEN. p. 143-144.

(15) HASTIE A.C., 1967 - Mitotic recombination in conidiophore of *Verticillium albo-atrum*. Nature. 214 : 249-252.

(16) HOLZAPFEL C.W., 1968 - The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. Tetrahedron. 24 : 2101-2119.

(17) HOLZAPFEL C.W., 1971 - Cyclopiazonic acid and related toxin in Ciegler A. et al. Microbial Toxins, t. VI. : 435-457.

(18) HOLZAPFEL C.W. and WILKINS D.C., 1971 - On the biosynthesis of cyclopiazonic acid. Phytochemistry. 10 : 351-358.

(19) HOLZAPFEL C.W., 1980 - The biosynthesis of tetramic acids. The Biosynt of Mycotoxins. Edited by Pieter S. Steyn. chapitre 10 : 327-355.

(20) IISUKA H. et IIDA M., 1962 - Maltoryzine, a new toxic metabolite produced by a strain of *A. oryzae* var. microsporus isolated from the poisonous malt sprout. Nature. t. CXCVI : 681-682.

(21) IKEDA Y., NAKAMURA K. et ISHITANI C., 1957 - A high frequency of heterozygous diploïds and somatic recombination induced in imperfecti fungi by ultra-violet hight.
J. Gen. app. microbiol. 3(1) : 1-11.

(22) INGRAM R., 1968 - *Verticillium dahliae* var. *Longisporum*, a stable diploïd.
Trans. Brit. Mycol. Soc. 51 : 339-341.

(23) ISHITANI C. and SAKAGUCHI K., 1959 a - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) :
I : Natural Variation.
J. Gen. appl. microbiol. 1 (4) : 246-257.

(24) ISHITANI C. and SAKAGUCHI K., 1955 b - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*) :
II : Morphological mutation.
J. Gen. appl. microbiol. 1 (4) : 258-271.

(25) ISHITANI C. and SAKAGUCHI K., 1955 d - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI-MOLDS (*A. oryzae* and *A. sojae*)
IV : Cytological studies.
J. Gen. appl. microbiol. 1 (4) : 283-297.

(26) ISHITANI C. and SAKAGUCHI K., 1956 a - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*A. oryzae* and *A. sojae*)
V : Heterocaryosis.
J. Gen. appl. microbiol. 2 (4) : 345-400.

(27) ISHITANI C., IKEDA K. and SAKAGUCHI K., 1956 b - Hereditary variation and genetic recombination in KOJI MOLDS (*A. oryzae* and *A. sojae*)
VI : Genetic recombination in heterozygous diploïds.
J. Gen. appl. microbiol. 2 (4) : 401-430.

(28) ISHITANI C., UCHIDA K. and IKEDA Y., 1956 c - The relation of DNA content to cell size in *Aspergillus*.
Exp. Cell. Research 10 : 737-740.

(29) KENNETH B., RAPER and DOROTHY I., FENNELL, 1953 - Heterokaryosis in *Aspergillus*.
Journal of the Elisha Mitchell. Scientific Society. 69 : 1-29.

(30) KEVEI F., PEBERDY J.F., 1970 - Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion.
Molec. Gen. Genet. 170 : 213-218.

(31) KINOSITA R.T. SEITO et P. SUMMER, 1965 - Toxicity of Koji (*A. oryzae*)
Feder. Proc. U.S.A. 24 : 627.

(32) KINOSITA R. et SHIKATA T., 1965 - On toxic mo ! dy rice in mycotoxins in foodstuffs.
Mass. inst. Technol. : 111-132.

(33) LASKER B.A. and BORGIA P.T., 1980 - High frequency heterocaryon. Formation by *Mucor racemosus*.
J. of bacteriology. 141 (2) : 565-569.

(34) LAFONT P. et J., PAYEN J., CHANY E., BERTIN G. et FRAYSSINET C., 1976 - Food Cos met toxicol. 14 : 137-139.

(35) LAILLIER-ROUSSEAU D., 1972 - Adaptation et mise au point d'une technique de crible de mutants auxotrophes chez *Penicillium baarnense* Van Beyma.
C.R. Acad. Sci. Paris. 274 : 2582-2584.

(36) LEACH J. and YODER O.C., 1982 - Heterocaryosis in *Cochliobolus heterosprophus*.
Experimental Mycology. 6 : 364-374.

(37) LE BARS J., 1979 - Cyclopiazonic acid bioproduction by *Penicillium camemberti* Thom. Effect of temperature on individual strains.
Ann. Rech. Vet. 10 (4) : 601-602.

(38) LE BARS J., 1979 - Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and Natural occurence of this Mycotoxinin cheese.
Appl. and Envin Microbiol. : 1052-1055.

(39) L'HERITIER Ph., 1975 - Génétique.
Masson et Cie Editeurs, Paris.

(40) LHOAS P., 1961 - Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploïds with p-fluorophenylalanine.
Nature. 190 : 744.

(41) LUK K.C., KOBBE B. and TOWNSEND J.M., 1977 - Production of cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus*.
Link. Appl. Environ. Microbiol. 33 : 211-212.

(42) MacDONALD K.D., 1968 - The selection of auxotrophs of *Penicillium chrysogenum* with nystatin.
Genetical research, Cambridge 11 : 327-330.

(43) MAHUZIER G., HAMON M., 1978 - Abrégé de Chimie analytique : Méthodes de séparation.
Edition Masson, Tome 2 : 155-160.

(44) MALARD P., 1981 - Contribution à la production d'α-amylase par *Aspergillus oryzae* (ALHB) Cohn.
Thèse de 3ème Cycle.

(45) MALENCON G. et RIEUF P., 1949 - Contribution à la flore mycologique du Maroc : Les Aspergillus.
Bull. Soc. Sc. Nat. Maroc, t. XXIX : 163-166.

(46) McGRATH R.M., STEYN P.S. and FERREIRA N.P., 1973 - J. Chem. Soc.
Commun p. 812.

(47) McGRATH R.M., STEYN P.S., FERREIRA N.P. and NEETHLING D.C., 1976 - Biosynthesis of cyclopiazonic acids in *Penicillium cyclopium* : the isolation of dimethylallylpyrophosphate : cyclo-aceto-acetyltryptophanyl dimethylallyltransferase.
Bioorg. Chem. 4 : 11-23.

(48) McGRATH R.M., NOURSE P.N., NEETHLING D.C. and FERREIRA N.P., 1977 -
Bioorg. Chem. 6 : 53.

(49) MOREAU C., 1974 - Moisissures toxiques dans l'alimentation.
Masson et Cie éditeurs.

(50) NEETHLING D.C. et McGRATH R.M., 1977 - Metabolic development and mitochondrial changes during cyclopiazonic acid production in *Penicillium cyclopium*.
Can. J. Microbiol. 23 : 856-872.

(51) OHMONO S., SUGITA M. and ABE M., 1973 - Isolation of cyclopiazonic acid, cyclopiazonic acide imine and bissecohydrocyclopiazonic acid from the cultures of *Aspergillus Versicolor* (Vuill).
Tiraboschi. J. Chem. Soc. Jpn. 47 : 83-89.

(52) ORTH R., 1977 - Mycotoxins of *Aspergillus oryzae* strains for use in the food industry as starters and enzymes producing molds.
Ann. Nutr. Aliment. 31 : 617-624.

(53) PEBERDY J.F., EYSSEN H., ANNE J., 1977 - Interspecific hybridization between *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium cyaneo-fulvum* following protoplast fusion.
Molec. gen. Genet. 157 : 281-284.

(54) PONTECORVO G., 1956 - The parasexual cycle in fungi.
Ann. Rev. microbiol. 10 : 393-400.

(55) PUHALLA J.E. et MAYFIELD J.E., 1974 - The mechanism of heterokaryotic growth in *Verticillium dahliae*.
Genetics 76 : 411-422.

(56) PURCHASE I.F.H., 1971 - The acute toxicity of the mycotoxin cyclopiazonic acid to rats. Toxicol. Appl.
Pharmacol. 18 : 114-123.

(57) RAPER K.B. et FENNELL D.I., 1973 - The genus *Aspergillus*.
R.E. Krieger Publishing Company Huntington, New-York.

(58) REISS J., 1975 - Mycotoxin bioassay using *Bacillus stearothermophilus*
J.A.O.A.C. 58 : 624-625.

(59) ROPPER J.A., 1952 - Production of heterocaryons diploïds in filamentous fungi.
Experentia. 8 : 14.

(60) SASSEN M.M.A., REMSEN C.C. and HESS W.M., 1967 - Fine structure of *Penicillium megasporum* conidiospores.
Protoplasma. 64 : 75-88.

(61) SCHABORT J.C., WILKINS D.C., HOLZAPFEL C.W., POTGIETER D.J.J. and NEITZ A.W., 1971 - β-cyclopiazonate oxydocyclase from *Penicillium cyclopium*. I : Assay methods, isolation and purification. Biochim. Biophys. Acta. 250 : 329-345.

(62) SHIMODA C., 1951 - An antibiotic substance, oryzacidin against saké putrefying bacteria produced by *Aspergillus oryzae*. I : isolation of oryzacidin. J. Agr. Chem. Soc. Japan 25 : 254-260.

(63) SHIMODA C., SHIMADA S. et SUGITA O., 1952 - An antibiotic substance oryzacidin produced by *Aspergillus oryzae*. II : The mutation of *Aspergillus oryzae* by irradiation with ultra-violet rays. J. Agr. Chem. Soc. Japan 26 : 645-647.

(64) SHIMODA C. et NISHIWAKI Y., 1954 - An antibiotic substance oryzacidin produced by *Aspergillus oryzae*. IV : Assay of oryzacidin by the cup method. J. Agr. Chem. Soc. Japan 28 : 832-837.

(65) SMITH J.E. and ANDERSON J.G., 1973 - Differentiation in the *Aspergilli*. Printed from the Symposia of the Society for General Microbiology.Number XXIII Microbial differentiation : 295-337.

(66) SNOW R., 1966 - Enrichissement method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic "Nystatin". Nature 211 : 206.

(67) SOBER H.A., 1968 - UV. Absorption characteristics of N. Acetyl methyl esters of the Aromatic Amino Acido, Cystine and of N-Acetylcysteine. Handbook of Biochemistry selected data for Molecular Biology : 13-18.

(68) STANTON A., HARRIS, LINDA V. FISHER and KARL FOLKERS, 1965 - The synthesis of tenuazonic and Congenerie tetramic acids. J. Med. Chem. 8 : 481.

(69) SUZUKI H., PANGBORN J. et KILGORE W.N., 1967 - Filamentoux cells of *E. coli* Formed in the presence of mitomycin. J. of Bact. 93 : 683-688.

(70) THOM Ch. et RAPER K.B., 1945 - Manual of the *Aspergilli*.
The Williams and Wilkins Company.

(71) THORBEK L. et EPLOV P., 1974 - The formation general characteristics and production of α-amylase in heterocaryons and diploïds of *Aspergillus oryzae*.
J. appl. Bact. 37 : 549-557.

(72) WEBER D.J., HESS W.M., 1976 - The fungal spore : Form and Function.
Ch.16 : Differentiation in ascomycetes spores (G. Turian).
Ed. J. Wiley and Sons : 715-788.

(73) WILSON B.J., WILSON C.H., HAYES A.W., 1968 - Tremorgenic toxin from *Penicillium cyclopium* grown on food materials.
Nature 220 : 77-78.

BENKHEMMAR Omar

Sujet : CONTRIBUTION A LA PROTECTION DES PRODUITS CEREALIERS TRAITES PAR *ASPERGILLUS ORYZAE* CONTRE LA POLLUTION PAR UNE MYCOTOXINE : L'ACIDE α-CYCLOPIAZONIQUE

RESUME

L'acide α-cyclopiazonique (αCA) est une mycotoxine produite par *Aspergillus oryzae*. L'émission de cette toxine dans les milieux de culture est mise en évidence après extraction chimique, par caractérisation en utilisant la chromatographie en couche mince, la spectrométrie ultra-violette et la RMN ^{1}H. Sa présence dans les milieux de culture est étroitement corrélée avec leur aptitude à inhiber la croissance bactérienne (*E. coli* et *B. subtilis*) et leur alcalinisation. Ces deux caractéristiques, faciles à mettre en évidence, nous ont servi de cribles pour isoler, après mutagenèse, des souches modifiées dans leur capacité à synthétiser l'αCA.

A partir de ces mutants, portant de plus une auxotrophie, la réalisation d'hétérocaryons "forcés" par confrontations (anastomoses végétatives) ou par fusions de protoplastes a permis d'aborder l'étude du système génétique contrôlant la production de cette toxine.

Des lignées hétérocaryotiques ont été obtenues entre mutants producteurs, entre mutants non producteurs, entre mutants producteurs et non producteurs d'αCA. Elles demeurent stables au moins jusqu'à la sixième génération asexuelle. Leur analyse suggère que la synthèse d'αCA est vraisemblablement contrôlée par un petit nombre de gènes. Chez les hétérocaryons isolés après confrontation entre mutants producteurs et non producteurs, la synthèse de la mycotoxine dépend de la proportion des génotypes parentaux et cette proportion est déterminée génétiquement.

MOTS CLES :

Aspergillus oryzae, Acide α-cyclopiazonique, Caractérisation chimique, Crible, Mutagenèse, Protoplastes, Hétérocaryose.